

**Universidad de las Américas Puebla**

Escuela de Ciencias

Departamento de Ciencias Químico-Biológicas

**UDLAP**®

Estudio de la actividad biológica de extractos de *Equisetum hyemale*, compuestos  
activos y preparación de nanomateriales con extractos

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta la estudiante

**Yulianna Minutti Calva**

**ID 165414**

**Licenciatura en Nanotecnología e Ingeniería Molecular**

**Dr. Eugenio Sánchez Arreola**

**San Andrés Cholula, Puebla**

**Primavera 2024**

Hoja de firmas

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta el estudiante  
**Yulianna Minutti Calva ID 165414**

**Director de Tesis**

---

**Dr. Eugenio Sánchez Arreola**

**Presidente de Tesis**

---

**Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas**

**Secretario de Tesis**

---

**Dr. Sergio Alberto Bernal Chávez**

## Índice

Agradecimientos.....	8
Capítulo I: Introducción	
I.I. Antecedentes.....	11
I.II. Justificación.....	16
Capítulo II: Marco Teórico	
II.I. Género <i>Equisetum</i> .....	18
II.I.I. <i>Equisetum hyemale</i> .....	18
II.II. Extracción.....	19
II.III. Maceración.....	20
II.IV. Pruebas fitoquímicas.....	20
II.V. Química de <i>Equisetum</i> .....	20
II.VI. Dispersión dinámica de luz.....	22
II.VII. Microscopía electrónica de barrido.....	22
II.VIII. Espectroscopía Infrarroja.....	23
II.IX. Espectroscopía UV-Vis.....	23
II.X. Resonancia magnética nuclear de hidrógeno.....	24
II.XI. Cromatografía de líquidos de alta eficacia.....	24
II.XII. Cromatografía de gases acoplado a masas.....	25
II.XIII. Rotavapor a presión reducida.....	25
II.XIV. Pruebas biológicas.....	25
II.XIV. I. Actividad antioxidante.....	26
II.XIV. II. Método Kirby-Bauer o difusión en disco.....	27
II.XIV.III. Modelos <i>in vivo</i> para toxicidad.....	27

II.XV. Patógenos.....	27
Capítulo III: Planteamiento del problema	
III.I. Hipótesis.....	33
III.II. Objetivo general.....	33
III.III. Objetivos específicos.....	33
Capítulo IV: Materiales y metodología	
IV.I. Reactivos, disolventes y equipo.....	35
IV.II. Obtención e identificación de la planta.....	36
IV.III. Proceso de obtención de la muestra.....	36
IV.IV. Maceración con disolventes orgánicos para la obtención de extractos.....	36
IV.V. Pruebas fitoquímicas preliminares.....	37
IV.VI. Preparación de medios de cultivo.....	38
IV.VII. Preparación de placas.....	38
IV.VIII. Modelo <i>in vivo</i> para toxicidad.....	39
IV.IX. Actividad antioxidante.....	39
IV.X. Nanopartículas de cobre.....	40
IV.XI. Liposomas.....	40
IV.XI. Caracterización de nanopartículas y liposomas.....	41
Capítulo V: Resultados y discusión	
V.I. Extracción.....	43
V.II. Pruebas fitoquímicas preliminares.....	43
V.III. Pruebas de actividad biológica.....	45
V.III. I. Método de Kirby-Bauer o difusión en disco.....	45

V.III. II. Ensayo de toxicidad <i>Artemia salina</i> .....	47
V.III.III. Actividad antioxidante.....	48
V.III.III. I. Actividad antioxidante de CuNPs .....	49
V.III. IV. Contenido total de flavonoides: extracto metanólico y acetato de etilo ...	50
V.IV. Cromatografía en columna silica gel.....	51
V.V. Espectroscopía infrarroja (FTIR)	
V.V.I Espectroscopía infrarroja (FTIR) de CuNPs.....	53
V.VI. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	53
V.VII. Dispersión dinámica de luz (DLS)	
V.VII. I. DLS NPs de cobre.....	54
V. VII. DLS liposomas.....	55
V.VIII. Espectroscopía UV-Vis	
V.VIII.I. NPs de cobre.....	56
V.VIII. II. Liposomas.....	58
V.IX. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	
V.IX.I. Nanopartículas de cobre.....	59
V.IX. II. Liposomas.....	60
V.X. Cromatografía de gases acoplado a masas.....	61
V.XI. Nanopartículas de cobre con bacterias.....	63
Capítulo VI: Conclusión y recomendaciones .....	68
Capítulo VII: Referencias.....	72
Capítulo VIII: Anexos.....	83

## Índice de Tablas

Tabla I. Rendimiento de extractos obtenidos de <i>Equisetum hyemale</i> .....	40
Tabla II. Resultados de pruebas fitoquímicas preliminares para los 4 extractos (hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanólico) .....	41
Tabla III. Resultados de actividad antimicrobiana de extractos de <i>E. hyemale</i> .....	43
Tabla IV. Análisis GC/MS de extractos de <i>Equisetum hyemale</i> .....	57
Tabla V. Resultados de actividad antimicrobiana de extractos de <i>E. hyemale</i> y nanopartículas de cobre.....	62

## Índice de Figuras

Figura I. Compuestos reportados de <i>E. hyemale</i> . A) ácido cafeico, B) ácido clorogénico, C) ácido gálico, D) Kaempferol 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y D) Quercetina... 13	
Figura II. Estructuras de compuestos genero <i>Equisetum</i> . A) Ácido cafeico, B) Quercetina, C) Nicotina y D) Palustrina. (Realizadas en ChemSketch) .....	19
Figura III. A) Extracto hexánico, B) Extracto clorofórmico, C) Extracto acetato de etilo y D) Extracto metanólico .....	40
Figura IV. Actividad antioxidante DPPH extractos <i>E. hyemale</i> .....	46
Figura V. Actividad antioxidante DPPH extractos <i>E. hyemale</i> y CuNPs.....	47
Figura VI. Análisis FTIR de <i>Equisetum hyemale</i> hexano (línea verde), cloroformo (línea naranja), acetato de etilo (línea azul) y metanol (línea morada) .....	50
Figura VII. Análisis FTIR de CuNPs con extractos de <i>E. hyemale</i> .....	51
Figura VIII. Distribución de tamaño de nanopartículas de cobre con A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico, C) extracto acetato de etilo y D) extracto metanólico. Extraídas de equipo: Nanotracc Wave II.....	52
Figura IX. Distribución de tamaño de liposomas POPC con A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico, C) extracto acetato de etilo y D) extracto metanólico. Extraídas de equipo: Nanotracc Wave II.....	53
Figura X. Espectro UV-Vis extractos de <i>E. hyemale</i> .....	54
Figura XI. Espectro UV-Vis de nanopartículas de cobre con extractos de <i>E. hyemale</i> ...	54
Figura XII. Espectro UV-Vis de liposomas POPC con extractos de <i>E. hyemale</i> .....	55

Figura XIII. Imágenes SEM de CuNPs con extractos de *E. hyemale*. A) hexano, B) cloroformo, C) acetato de etilo y D) metanol.....56

Figura XIV. Imágenes SEM de los liposomas con extractos de *E. hyemale*. A) hexano, B) cloroformo, C) acetato de etilo y D) metanol.....57

## **Agradecimientos**

*A mis profesores*, por las enseñanzas que me dieron a lo largo de este tiempo. En especial a mis sinodales por aceptar ser parte de mi comité y al Dr. Eugenio por aceptarme en su proyecto. Cada uno de ustedes me dieron las herramientas necesarias durante este tiempo.

*A mis papas*, por apoyarme en cada etapa de mi vida y escucharme a cada rato; entenderme y siempre estar ahí cuando los necesité.

*A mi hermano*, por apoyarme y preguntarme como iba en el laboratorio a pesar de que pasaba más tiempo ahí que en otro lugar.

*A mis amigos*, por estar y sacarme de vez en cuando del laboratorio. Gracias por su amistad.

*A Jorge*, por su amistad incondicional, por enseñarme demasiadas técnicas de laboratorio y perfeccionar otras. Alentarme a ser mejor. Aunque no se podía, tú siempre fuiste mi codirector de tesis. Sé que vas a ser un gran ser humano e investigador.



## **CAPÍTULO I**

## 1. Introducción

Actualmente la medicina tradicional es un recurso fundamental en la salud humana. Las plantas y árboles que se han empleado han servido como base para la medicina moderna. No obstante, en algunas zonas indígenas, las plantas medicinales son el único recurso que disponen a falta de instituciones médicas (Blanca Escamilla, 2023). Las bases científicas para el uso eficaz y seguro de plantas medicinales se relacionan con investigaciones realizadas. Las plantas medicinales constituyen un tipo de medicina debido a su composición química. La composición de cada una de estas podría actuar sobre el mecanismo fisiológico o patológico del organismo (Soria, 2018).

El consumo de plantas medicinales ha incrementado en los últimos años debido los metabolitos secundarios que estas poseen. Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), establecen que por medio de la bio-inspección de agentes biológicos se podrían diseñar alternativas de tratamiento a diferentes patógenos.

Una de las limitantes de los tratamientos contra infecciones, además de enfermedades como en cáncer suelen ser paliativas. Además, pueden dañar el ADN y originan lesiones externas. Ya que sólo una quinta parte de los pacientes tienen tumores curables en el caso del cáncer. El único tratamiento disponible con intención curativa es la cirugía seguida de una quimioterapia adyuvante (Robatel and Schenk, 2022).

No obstante, las limitaciones para infecciones se deben a grandes desafíos debido a que muchos laboratorios carecen de pruebas de susceptibilidad, por ejemplo, para *Cándida spp.* Dado este panorama, algunos modelos de respuesta incluyen el uso de compuestos naturales en las fórmulas de algunos antibióticos (Delgado and Cerdas, 2021; Gautam and Jachak, 2009).

Existen numerosas investigaciones que buscan encontrar compuestos naturales y enfocarlos a la actividad biológica. Por ejemplo, varias de estas líneas de estudio están dirigidas al estudio de la familia Equisetaceae.

Equisetaceae es una familia monotípica de plantas herbáceas y vivaces. Mismas tiene rizomas y tallos articulados. El género *Equisetum* es de los pocos representantes de la familia que ha subsistido. Los representantes del género *Equisetum* destacan por la presencia de un rizoma

articulado del que se forman tallos aéreos huecos (de Queiroz et al., 2015). Dicho género comprende aproximadamente 20 especies. Sin embargo, en México, se localizan cinco especies principales; por ejemplo, *Equisetum arvense*, *Equisetum hyemale*, *E. laevigatum*, *E. myriochaetum* y *E. telmateia* (Sandhu et al., 2010). *Equisetum arvense*, también conocida como cola de caballo tiene propiedades bactericidas, así como actividad diurética, antiinflamatoria y hepatoprotectora (Dos Santos et al., 2005). De la misma forma, otras actividades reportadas son; antioxidantes, antidiabéticas, antimicrobianas, cosméticas, antiproliferativa, antiulcerógeno. Además, aún no se tiene estudios suficientes, sin embargo, puede mostrar actividad anticancerígena (de Queiroz et al., 2015; Sureshkumar et al., 2023).

Sin embargo, así como otras fuentes naturales algunas desventajas presentes en productos de esta índole se atribuyen a su poca solubilidad, las cantidades de los activos son bastante bajos al ponerlos en medicamentos, atenúan la señalización proinflamatoria asociada a los rayos UV (Zhang et al., 2018). De igual manera, se debe de tener en cuenta sus efectos adversos, su estabilidad y biodisponibilidad (Peng et al., 2019).

El presente trabajo propone la investigación de la actividad biológica de *Equisetum hyemale* a partir de la obtención y purificación de extractos vegetales de polaridad creciente. De igual manera, tiene por objetivo preparar nanopartículas de cobre y liposomas para la encapsulación de los extractos obtenidos como una alternativa nanobiotecnológica.

## **I.I. Antecedentes**

Actualmente la medicina tradicional es un recurso fundamental para la salud humana. Las plantas empleadas son la base para el desarrollo de la medicina moderna. En años anteriores, las especies utilizadas eran solo nativas. Actualmente también se emplean algunas introducidas o externas al lugar dónde se esté realizando la investigación (López Villarreal et al., 2022).

En este sentido, se ha investigado a la familia de plantas *Equisetaceae* o cola de caballo debido a que forman parte de un antiguo grupo de plantas productoras de esporas. En la actualidad, *Equisetum* es el único género superviviente con 15 subespecies clasificadas en dos subgéneros (*Equisetum* e *Hippochaete*). Tipke et al. (2019) han descrito la presencia de varios alcaloides únicos en este género por medio de métodos analíticos como cromatografía

de líquidos de alta eficiencia y espectroscopía infrarroja. Como resultado a ello, se reportó la presencia de nicotina en una de las especies de este género. Por otro lado, las propiedades farmacológicas notificadas de *Equisetum hyemale* respaldan su uso en la medicina tradicional, aunque existen pocos estudios del uso tradicional para experimentos clínicos (Sureshkumar et al., 2023). La información documentada reveló que el género no solo es un remedio herbal sino también tiene varios bioactivos con potencial uso para nuevos fármacos. Con ello, en este estudio se afirmó que hay que seguir estudiando sus bioactivos y relación estructura-actividad con el fin de ver la acción asociada.

Dos Santos Alves et al. (2019) estudiaron las sustancias luteolina, ácido ferúlico y cumarina ya que fueron identificados en concentraciones elevadas mediante cromatografía de ultra alto rendimiento por electrospray. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante microdilución en caldo. Los compuestos fenólicos reportados fueron capaces de inhibir el crecimiento visible de cepas bacterianas a bajas concentraciones de cada uno de los extractos realizados. Con ello, en el artículo presente se sugiere que *E. hyemale* puede ser una alternativa para el tratamiento de infecciones por microorganismo resistentes a fármacos sintéticos (Alves et al., 2019).

Por otro lado, otro estudio presentó algunos de los metabolitos secundarios identificados en este género. Estos fueron carotenoides y glucósidos fenólicos presentes en extractos de brotes aéreos y rizomas subterráneos. Las muestras indicaron la acumulación de dichos compuestos específicos para cada una de las especies estudiadas (*E. arvense*, *E. hyemale*, y *E. telmateia*). Uno de los resultados obtenidos fue que los glucósidos fenólicos fueron los que más contribuyen positivamente a la separación de muestras de rizomas en comparación con los extractos de brotes aéreos (Jin et al., 2014; Parrish et al., 2022).

Se toma en cuenta lo anterior, ya que el extracto metanólico de las partes aéreas ha mostrado la presencia de metabolitos secundarios como rutina, quercetina y algunos glucósidos fenólicos. Aunque se analizará la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, citotoxicidad entre otras, cabe recalcar, que las partes aéreas de *Equisetum hyemale* poseen propiedades anticorrosivas por los compuestos mencionados anteriormente. Esta propiedad no se ha estudiado a fondo, por lo que los parámetros aún no están evaluados (“*Equisetum hyemale*,” 2021)

Por último, algunos de los extractos estudiados de esta especie son el hexánico, metanólico, etanólico, acetato de etilo, diclorometano y acuoso. Cada uno de estos extractos vegetales ha sido sometido a distintos análisis. Algunos de los más empleados son; espectroscopía infrarroja, UV-Vis, cromatografía y resonancia magnética nuclear (RMN). Las propiedades que posee cada uno de ellos es debido a los compuestos identificados y aislados. No obstante, aún se debe de estudiar a profundidad cada uno de los metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos para poder analizarlos e identificar la relación actividad-estructura para uso futuro en la medicina moderna (Aguayo-Morales et al., 2023; Pandey and Khatoon, n.d.; Radojevic et al., n.d.).

Se ha reportado en literatura científica la presencia de compuestos fenólicos en extractos etanólicos y metanólicos como el ácido cinámico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido gálico, quercetina, luteolina y flavonas. En cada uno de estos extractos se ha demostrado que el contenido de ácido gálico es 41.9 mgEAG/g (mg equivalentes de ácido gálico) por gramo de muestra analizada y 5.5 mgEQ/g (equivalentes de quercetina) de quercetina (Aguayo-Morales et al., 2023).

Dentro de los extractos metanólicos y etanólicos de la parte aérea se han encontrado flavonoides como quercetina, kaempferol 3,7,4'-O-triglucósido, kaempferol 3,7-O-diglucósido. Los compuestos mencionados tienen propiedades farmacológicas, como actividad antimicrobiana, antioxidante, antiviral y anti-mutagénica (Aguayo-Morales et al., 2023; Alves et al., 2019). No obstante, en un análisis cromatográfico realizado se demostró la presencia de cicloartenol. Cicloartenol tiene efectos antiinflamatorios al inhibir la proliferación celular. Además, muestra respuestas antioxidantes y antitumorales (Boeing et al., 2021).

Se han identificado fitoquímicos similares en fracciones de *E. hyemale* obtenidos con éter dietílico, hexano y cloroformo mediante maceración como ácidos grasos insaturados, diversas flavonas y carotenoides. Algunas de los compuestos presentes en fracciones de extracto hexánico registrados por medio de distintas técnicas como cromatografía de líquidos y espectroscopía de gases acoplado a masas son; 2,4-dihidroxiheptadec-16-enil acetato, 5-hidroxi-3,4,7-trimetoxiflavona y 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acrilato de butilo (Sureshkumar et al., 2023).

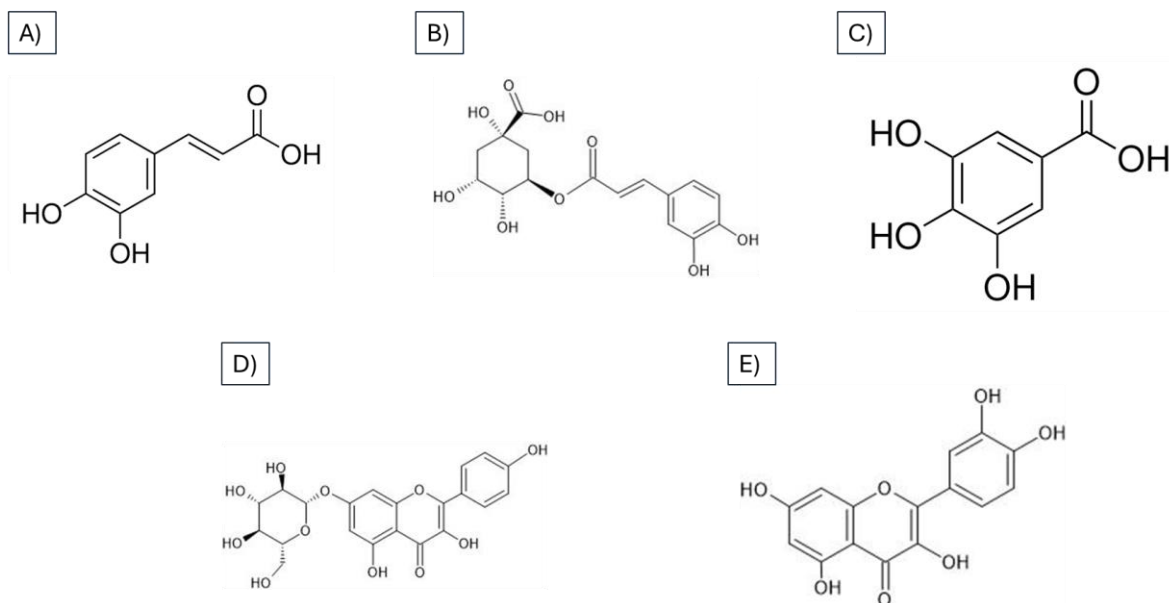


Figura I. Compuestos reportados de *E. hyemale*. A) ácido cafeico, B) ácido clorogénico, C) ácido gálico, D) Kaempferol 7-O-β-D-glucopiranosido y D) Quercetina. (Realizados en ChemSketch)

Por otro lado, las fracciones del extracto de acetato de etilo han mencionado la presencia de ácido ferúlico y cumarina. El ácido ferúlico es clasificado como un agente antiinflamatorio y antioxidante, mientras que la cumarina se le atribuye actividad farmacológica y respuesta defensiva de la planta ante patógenos externos (Alves et al., 2019).

En otro estudio, con distintos extractos de *Equisetum hyemale* se redujo la viabilidad celular de un 30% a 60% con tres concentraciones (0.6, 1.2 y 2.4 mg/mL). Sin embargo, el efecto observado no dependió de la concentración y el tiempo de incubación. Por otra parte, en el mismo estudio la viabilidad de los fibroblastos de piel porcina se redujo de un 60 a 80% con todas las concentraciones anteriores. No obstante, se reportó que tras 72 horas de tratamiento con el extracto, la viabilidad se mantuvo (Aguayo-Morales et al., 2023).

En relación con la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria atribuida a los extractos de *E. hyemale* se explicó que el efecto antimicrobiano ocurre a concentraciones 10 a 30 veces mayores que el efecto antiinflamatorio (de Queiroz et al., 2015). Por último, desde su descubrimiento; los liposomas han sido ampliamente utilizados como modelos de membrana y encapsulación. Con posterioridad, se han empleado como sistemas de transporte, tanto en la industria farmacéutica como la cosmética (Torelló et al., 2002).

Los liposomas son estructuras esféricas que se forman espontáneamente cuando los lípidos se dispersan en un medio acuoso. Los lípidos que se utilizan pueden ser de origen natural o

sintético y se caracterizan por presentar una cabeza hidrofílica y una parte hidrofóbica. Por otra parte, también pueden contener un grupo denominado grupo esqueleto que sirve de puente entre la parte polar y la no polar. Este grupo es usualmente glicerol o esfingosina. A partir de ello, da lugar a los denominados glicerolípidos y esfingolípidos (Çoban et al., 2023). La lecitina ha sido ampliamente utilizada en la elaboración de liposomas, es una fuente natural de fosfolípidos, los cuales por sus propiedades anfifílicas en presencia de agua permiten la formación de los sistemas de membrana cerrados llamados liposomas (Bonechi et al., 2018).

Los liposomas se encuentran entre los sistemas más efectivos reportados en la literatura para encapsulación ya que poseen una excelente capacidad para incorporar sustancias hidrofílicas, hidrofóbicas y anfifílicas. Además, estos protegen a los compuestos encapsulados de agentes externos como pH, oxígeno, enzimas y digestión en el estómago, con ello se mejora su biodisponibilidad y liberación en blancos particulares. Es por ello, que varios compuestos antioxidantes extraídos de plantas han sido encapsulados en liposomas (Peng et al., 2019). En esta investigación se empleará el fosfolípido 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC). Este es un fosfolípido con una cabeza polar y dos colas apolares.

Por otro lado, en cuanto a las nanopartículas de cobre han tenido un gran impacto en nanomedicina y biotecnología por sus propiedades y morfología. Las nanopartículas pueden unirse mediante interacciones electrostáticas, interactivas o de unión a ranuras (Amjad et al., 2021).

El cobre se ha convertido en un metal de interés debido a su presencia natural en los sistemas biológicos, propiedades antimicrobianas y su mayor rentabilidad en comparación con el oro y la plata (Antonio-Pérez et al., 2023). Es importante señalar que las características y la toxicidad de las nanopartículas de cobre (CuNPs) están influenciadas por distintos factores como la composición del agente biológico, la sal precursora utilizada, condiciones de síntesis y el tamaño de partícula resultante. Sin embargo, se ha reportado procesos de síntesis para obtener NPs con alta actividad antimicrobiana y baja toxicidad (Sánchez-Sanhueza et al., 2016).

En este trabajo se realizaron CuNPs por una síntesis verde. La síntesis de nanopartículas metálicas implica algunos componentes principales; en este caso implican agentes reductores y estabilizadores, en conjunto con un medio disolvente.

En este caso, las soluciones de sales precursoras de cobre metálico se mezclan con extractos de plantas en condiciones de reacciones específicas. En primer lugar, el cobre iónico es susceptible a recibir electrones de los compuestos vegetales con capacidad reductora. Los grupos funcionales presentes en los diferentes compuestos de la planta dotan de una capacidad redox que les permite participar en la biosíntesis de las NPs como agentes reductores, quelantes y conservantes de las NPs (Antonio-Pérez et al., 2023).

## **I.II. Justificación**

La aparición de nuevas enfermedades, así como el surgimiento de otras, hace hincapié en el estudio de nuevas alternativas para su tratamiento o mitigación. Una de estas alternativas es el uso de distintas plantas. Por lo que el presente trabajo propone la investigación de la actividad biológica de *Equisetum hyemale*, así como la obtención de sus compuestos activos. La identificación de dichos compuestos será de utilidad para conocer su estructura. Asimismo, al tener en cuenta los diferentes compuestos activos, se podrá ver el efecto del extracto en los diferentes patógenos ya que no se ha explorado a fondo su actividad antimicrobiana y antioxidante. De igual manera, se analizará la actividad biológica que tenga el extracto al estar unido a nanopartículas de cobre y liposomas. Al estar unido tanto en nanopartículas de cobre como en liposomas potenciará su actividad antimicrobiana y antioxidante, siendo el efecto mayor con estos nanomateriales.



## **CAPÍTULO II**

## II. Marco Teórico

### II.I. Género *Equisetum*

*Equisetum* o mejor conocida como cola de caballo, es el único género viviente de la división *Equisetophyta*. Los equisetos son plantas denominadas criptógamas vasculares y herbáceas con hojas verticiladas. Además, estas poseen tallos fotosintéticos articulados y con un estróbilo terminal (Gallardo-Pérez et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, el estróbilo tiene una posición terminal. En la mayoría de las especies, los estróbilos se sitúan en el extremo de tallos vegetativos verdes. Sin embargo, en pocas especies, los estróbilos se localizan al final de tallos gruesos. Estos pueden persistir y tornarse verdes una vez que las esporas se han dispersado (Ferriol Molina, 2019). Una de las propiedades que hacen única a este género es su alto contenido de sales de sílice, algunas de ellas son hidrosolubles (Villar Del Fresno and Peinado, 2006).

Por otro lado, aunque todavía las especies modernas sobrevivan. Existen alrededor de 20 especies del género *Equisetum*. La distribución de dichas especies se encuentra desde los trópicos hasta el ártico, exceptuando Australia y Nueva Zelanda. En México, se pueden encontrar las especies *E. arvense*, *E. hyemale*, *E. laevigatum*, *E. myriochaetum* y *E. telmateia* (Gallardo-Pérez et al., 2006).

De acuerdo con su descripción botánica y lo mencionado anteriormente. El equiseto es una planta que puede alcanzar los 50 centímetros de altura. Posee un color verde característico. Además, de tallos huecos y recorridos por 6-12 surcos no muy profundos y ramas secundarias con 4 ángulos (Dos Santos et al., 2005).

Este tipo de planta se ha empleado con fines terapéuticos debido a las investigaciones fitoquímicas y los estudios farmacológicos. Sus acciones diuréticas son suaves y se atribuyen a los componentes flavónicos y saponínicos de la planta (Villar Del Fresno and Peinado, 2006).

#### II.I.I *Equisetum hyemale*

*E. hyemale* es el equiseto con mayor popularidad en México. Tiene distintos nombres de acuerdo con la región en dónde este se encuentre. Sin embargo, es mejor conocido como cola de caballo de invierno.

Es una hierba que puede medir hasta dos metros de altura, con tallos huecos quebradizos y cilíndricos de color verde oscuro sin ramificaciones. También posee anillos espaciados que se encuentran alrededor del tallo. Mismas salen de las articulaciones. Los frutos son conos pequeños que se encuentran en la parte terminal de la planta (Gallardo-Pérez et al., 2006).

Las pequeñas hojas que se pueden observar en esta especie son de 1 cm de largo y ancho. Están unidas formando una vaina o corona alrededor del tallo. Al igual que los helechos y otras especies primitivas. Los equisetos carecen de flores. Su propagación se realiza mediante las esporas generadas a partir de esporangióforos localizados en posición terminal en los tallos (Alves et al., 2019).

*E. hyemale* es originaria de Norteamérica. Habita en climas semisecos, secos y templados entre los 1000 y 2600 metros sobre el nivel del mar. Está asociada a diferentes vegetaciones tales como la acuática, barrancas del bosque mesófilo de montaña y bosque de pino.

La cola de caballo es empleada en enfermedades renales y de vías urinarias. En el estado de Puebla se emplea hervida. Sin embargo, en Hidalgo, esta cocción se usa preparada junto con otro tipo de especies y plantas como flor de peña (Gallardo-Pérez et al., 2006). Se ha demostrado experimentalmente las actividades diuréticas, antiinflamatorias y antiespasmódicas. Estas comprueban la efectividad de la planta para la mayoría de los usos tradicionales reportados anteriormente (Boeing et al., 2021).

## **II.II. Extracción**

La extracción es una técnica de separación y purificación para aislar una sustancia de una mezcla tanto sólida como líquida. La clasificación de esta técnica depende del estado físico de los materiales, este puede ser sólido-líquido o líquido-líquido (Villamizar-Véliz and Aular, 2022). El primer método; sólido-líquido consiste en la penetración del líquido en poros del sólido. Asimismo, se disuelven los componentes a extraer (extracción física)

o entra en reacción con ellos (extracción química). La sustancia pasa a la disolución o el producto se difunde hacia la superficie del cuerpo sólido y pasa a la masa fundamental del líquido (Sánchez, 2016).

Por otro lado, la técnica de extracción líquido-líquido está basado en la inmiscibilidad entre las dos fases que se generan a temperatura ambiente y presión constante. Los distintos solutos presentes se distribuyen entre la fase acuosa y otra fase orgánica de acuerdo con sus solubilidades relativas (Sosa Parra, 2018).

### **II.III. Maceración**

La maceración es una extracción sólido-líquido. En este método el material crudo se pone en contacto con una cantidad suficiente de solvente a temperatura ambiente para poder lograr su extracción completa. La materia vegetal se mezcla debidamente triturado con un solvente hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Después de ello, se filtra el líquido y se somete a evaporación por medio de un rotavapor (Benítez-Benítez et al., 2019). Con ello se obtiene el extracto vegetal deseado. Los compuestos presentes en el extracto se pueden analizar mediante pruebas fitoquímicas preliminares.

### **II.IV. Pruebas fitoquímicas**

Las pruebas fitoquímicas preliminares tienen la facilidad de ser un procedimiento útil, sensible, específico, rápido y sencillo a nivel de laboratorio ya que se requiere de equipo mínimo a utilizar.

Actualmente, se tienen desarrollados una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes compuestos químicos de una planta. Consistente en una reacción química que produce una alteración rápida en la estructura molecular del compuesto. Dicha alteración puede ser la modificación de un grupo funcional, apertura de un sistema anular o la formación de un complejo. Lo cual da por resultado un cambio de color, un precipitado o el desprendimiento de un gas (Coy Barrera et al., 2014)

Existen diferentes pruebas fitoquímicas preliminares para detectar flavonoides, taninos, alcaloides, terpenos, esteroides entre otros.

### **II.V. Química de *Equisetum***

Existen varios estudios que demuestran que las plantas de este género contienen esteroides, trazas de alcaloides entre ellos la nicotina, ácidos fenólicos, carboxílicos. Por otra parte, se han identificado flavonoides que no sólo tienen interés porque intervienen en la actividad farmacológica, sino que también constituyen mercados taxonómicos en los distintos equisetos (Villar Del Fresno and Peinado, 2006). En la Figura II se muestran algunos compuestos reportados en el género *Equisetum*. *E. arvense* contiene varios de estos compuestos como ácido cafeico, quercetina, ácido linoleico, entre otros (Boeing et al., 2021). No obstante, en el extracto metanólico se reporta por DukiK y colaboradores la presencia de 4'-O-metilequisetumpirona (Mimica-Dukic et al., 2008).

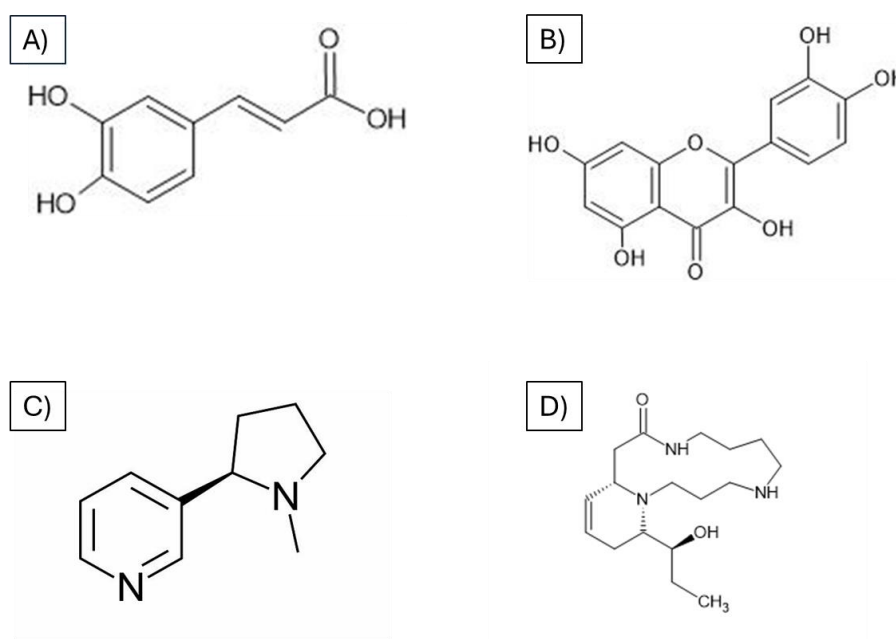


Figura II. Estructuras de compuestos genero *Equisetum*. A) Ácido cafeico, B) Quercetina, C) Nicotina y D) Palustrina. (Realizadas en ChemSketch)

*E. bogotense*, *E. debile* y *E. hyemale* presentan quercetina como metabolito secundario en común. *E. bogotense* presenta nicotina y palustrina en la mayoría de los extractos obtenidos. *E. debile* reporta quercetina y kaempferol. *E. hyemale*, dependiendo del extracto es el compuesto reportado. Sin embargo, mayoritariamente se ha analizado quercetina, ácido cafeico, ácido linoleico, ácido gálico y kaempferol (Boeing et al., 2021; Čanadanović-Brunet et al., 2009; Sureshkumar et al., 2021; Tipke et al., 2019).

Por otro lado, el análisis HPLC-ESI-MS/MS demostró la presencia de nicotina en al menos una muestra de cada especie de *Equisetum*. La cantidad total de nicotina no superó los 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y los 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para el subgénero *Equisetum* e *Hippochaete* respectivamente. Sólo una de las especies de *Equisetum*; *E. bogotense* demostró en este estudio ambos alcaloides (palustrina y palustridieno) a niveles muchos más altos (20-800  $\text{mg}/\text{kg}$ ) (Tipke et al., 2019).

## II.VI. Dispersión dinámica de luz

La técnica de dispersión de luz presenta una serie de ventajas sobre otros métodos. Es posible realizar experimentos con una amplia gama de concentraciones y temperaturas. Es una técnica no invasiva que requiere cantidades bajas de muestra. Esta técnica es empleada para determinar la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros. Por ejemplo, el tamaño de nanopartículas para uso en nanomedicina o en otras áreas de interés (Bhattacharjee, 2016) .

Normalmente, un láser proporciona una luz incidente monocromática, la cual se incide sobre la muestra con pequeñas partículas en movimiento browniano. Después de ello, a través del proceso de dispersión de Rayleigh las partículas cuyos tamaños son suficientemente pequeños en comparación con la onda de luz incidente difractarán la luz en toda dirección con diferentes longitudes de onda (Morán and Alejandro, 2019). La dispersión de luz está altamente correlacionada con la distribución de tamaños de partículas analizadas (“2.4,” 2022).

## II.VII. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica de análisis topográfico, estructural, y composicional. Esta técnica se ha empleado extensamente en el estudio de semiconductores, nanopartículas, modificación de productos comerciales, catálisis.

La idea de funcionamiento de este método es la generación de un haz de electrones de alta energía y se usa un sistema de lentes para focalizar el haz y hacerlo incidir sobre la muestra. La muestra genera a su vez electrones llamados electrones secundarios o retro dispersados como respuesta al impacto electrónico. Dichos electrones salen de la muestra y son detectados mediante dispositivos especializados (Clavijo Penagos, 2013).

Dada la alta resolución que se puede lograr con el SEM es posible conocer las características más detalladas de un material como su estructura cristalina, porosidad, morfología superficial e incluso su composición química (Barrera et al., 2000).

### **II.VIII. Espectroscopía Infrarroja (FTIR)**

La espectroscopía infrarroja se basa en la absorción por parte de la materia en la región correspondiente a longitudes de onda entre 780 nm y 1mm. Los fotones de la radiación infrarroja son menos energéticos que los correspondientes a la región visible. La absorción de radiación infrarroja (IR) se ve condicionada por la existencia de enlaces químicos covalentes que puedan oscilar con respecto a una posición de equilibrio. Es decir, únicamente absorberán radiación IR especies moleculares con la excepción de moléculas diatómicas homonucleares (Skoog et al., 2017).

Cada grupo funcional absorberá a una o varias longitudes de onda características correspondientes, cada una de ellas a un modo de vibración diferente. Con ello, da lugar a un espectro característico. Según, la fortaleza de los enlaces y la masa de los átomos implicados será necesario más o menos energía para que se produzca la absorción de la radiación (Coleman, 1993).

### **II.IX. Espectroscopía UV-Vis**

La espectroscopía UV-Vis es una de las herramientas más utilizadas en química analítica, tanto en el análisis cualitativo como en el cuantitativo. Uno de los usos de esta técnica es la identificación y determinación de la concentración de un analito en disolución (Skoog et al., 2017).

Esta técnica utiliza radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta cercana e infrarroja cercana. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas (Martínez and María, 2012).

Los máximos de absorción se deben a la presencia de cromóforos en la molécula; es decir la parte de la molécula responsable de la absorción de luz. Se considera fundamental la ley de Lambert-Beer en esta técnica. Esta ley relaciona la concentración de un analito absorbente con el espesor de muestra y con su absorbancia (Martínez and María, 2012).

## **II.X. Resonancia magnética nuclear de hidrógeno**

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica ampliamente utilizada para el análisis estructural de compuestos orgánicos. Dicha técnica se fundamenta en la absorción de radiofrecuencias por un núcleo atómico sometido a un campo magnético (Ramírez, 2002.)

Se centrará en la Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno ( $^1\text{H}$ -RMN). El superíndice 1 indica que se medirá el isótopo  $^1\text{H}$ . Al aplicar un campo magnético externo, los núcleos de los átomos de hidrógeno alinean su spin a favor o en contra del campo. Los protones que orientan su spin a favor del campo se denominan protones alfa. Mientras, que aquellos que lo orientan en contra del campo se denominan protones beta (Laurella, 2017). Cabe mencionar que los espectros RMN suelen mostrar un gráfico de absorbancia contra desplazamiento químico, que es equivalente a un gráfico de absorbancia vs frecuencia aplicada. Es importante mencionar que a medida que el desplazamiento químico aumenta, la frecuencia también aumenta. Aquellos protones que absorben a desplazamientos altos absorben a campos bajos. Por el contrario, para los que absorben a desplazamientos químicos bajos absorben a campos altos (Laurella, 2017).

## **II.XI. Cromatografía de líquidos de alta eficacia**

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es una técnica instrumental utilizada en análisis químicos con la cual se permite separar mezclas, purificar y cuantificar componentes. Esta técnica consiste en una mezcla compuesta por el analito o la muestra de interés. Además, de uno o más solventes que actúan como la fase móvil. Es decir, la que arrastra al analito por todo el equipo de HPLC y la columna (“Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC),” 2020).

Como se mencionó anteriormente existe una fase móvil y una columna cromatográfica. La fase móvil o eluyente debe de desgasificarse primero. De tal modo que las burbujas no afecten la separación de las moléculas del analito. Por otro lado, la columna cromatográfica se ubica dentro de un horno que permite regular la temperatura (Moreno, 2001).

La fase móvil con el analito disuelto ingresa a la columna y de ella eluyen las moléculas que son menos afines a la fase estacionaria. Mientras, que las moléculas que tienen una afinidad mayor son retenidas por ella. Cada molécula eludida genera una señal en el cromatograma,



dónde se observan los tiempos de retención de las moléculas separadas (“Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC),” 2020).

### **II.XII. Cromatografía de gases acoplado a masas**

La cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS por sus siglas en inglés) es una técnica que se considera una de las más viables para analizar metabolitos debido a su alta resolución cromatográfica. Además, de las condiciones estandarizadas de ionización que permiten establecer una biblioteca de espectros de masas (Kvitvang et al., 2011). Esta técnica se basa en la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles. La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias analizadas entre la fase móvil y la fase estacionaria que conforman el sistema (Sureshkumar et al., 2023).

Una vez separadas las sustancias son fragmentadas y analizadas en función del patrón de fragmentación de cada una de ellas. Este puede ser comparado con información contenida en base de datos de espectros de masas para su identificación preliminar. La identificación definitiva, así como la cuantificación de la sustancia debe hacerse mediante una sustancia de referencia (Aguayo-Morales et al., 2023).

### **II.XIII. Rotavapor a presión reducida**

El método empleado para eliminar disolventes en el laboratorio es la técnica de evaporación rotativa o rotavaporación. Un rotavapor rotativo es una destilación a presión reducida en dónde una solución en un matraz de fondo redondo se coloca en un baño de agua. Esta solución se gira mientras el sistema está parcialmente evacuado mediante un aspirador de agua y una bomba de vacío (Carmona-Hernández, n.d.; Hernández et al., 2015).

La presión reducida en el sistema hace que el disolvente hierva a una temperatura inferior a la normal. La rotación del matraz aumenta la superficie del líquido y por lo tanto la velocidad de evaporación. El vapor del disolvente se condensa, con ello entra en contacto con un condensador de agua y gotea en un matraz receptor (Saldías Villanueva, 2011).

### **II.XIV. Pruebas biológicas**

Los compuestos presentes en plantas medicinales brindan oportunidades ilimitadas para nuevos prospectos de medicamentos. En la actualidad, centros de investigación buscan y analizan los compuestos bioactivos de distintas plantas con el fin de obtener medicamentos terapéuticos a base de productos naturales. Estos compuestos pueden tener actividad anticancerígena, antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, analgésica, fotoprotectora. Las propiedades biológicas de la planta indican una estrecha relación entre la fitoquímica, la farmacognosia y el uso de la planta en la medicina tradicional de las especies utilizadas. Esto dependerá de la región y de lo que se quiere estudiar (Hernández et al., 2015) (Silva et al., 2003).

#### **II.XIV.I Actividad antioxidante**

Las especies reactivas de oxígeno, entre otros radicales pueden generar estrés oxidativo. Por lo cual se le atribuye muchas enfermedades degenerativas. Se ha evidenciado que las plantas y sus constituyentes son fuente de antioxidantes. Los antioxidantes son conocidas como moléculas que actúan antes y durante una reacción en cadena. Como se mencionó anteriormente, los antioxidantes derivados de plantas desde el punto de vista fitoquímico pueden ser taninos, cumarinas, flavonoides, entre otros. Los cuales a partir de sus propiedades óxido-reducción pueden actuar como donadores de protones y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de dichas enfermedades (Tovar del Río, 2013).

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose en un ensayo de prueba. Para evaluar la actividad antioxidante, la gran mayoría de los ensayos utilizados se dividen en dos categorías. Una de ellas es basada en la reacción por transferencia de electrones. Otra de ellas, está basado en la transferencia de átomos de hidrógeno (Ravichandran et al., 2014).

Los ensayos basados en la transferencia de electrones involucran una reacción óxido-reducción con el oxidante como un indicador del punto final de la misma. Entre estos ensayos, se encuentra el método DPPH. Esta molécula es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa. Dicha deslocalización intensifica el color violeta, misma que absorbe a 517 nm (Tovar del Río, 2013).

## II.XIV.II Método Kirby-Bauer o difusión en disco

La prueba o método de Kirby-Bauer es usado para evaluar la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos, además en este caso a cada uno de los extractos. Este método se basa en la colocación de discos impregnados con antibiótico en placas de agar inoculadas con el microorganismo que está siendo probado o estudiado. El método de Kirby-Bauer es empleado como se mencionó anteriormente para analizar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico (Kebede and Shibeshi, 2022).

En este caso se evaluaron diferentes cepas de microorganismos entre ellas; *P. aeruginosa*, *S. aerus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, y *P. mirabillis*. Cada uno de ellos fue inoculado en placa con agar Müller-Hinton a 37°C. Después de ello, se colocaron 7 discos; 6 de ellos con 30 µL de cada una de las concentraciones de extracto y el 7° disco con 10 µL de fosfomicina como control positivo. La fosfomicina es un antibiótico utilizado para tratar infecciones en el tracto urinario. Cada una de las placas fue destinada a una bacteria y con un extracto. Los extractos evaluados para cada microorganismo fueron; hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanólico. Además, las concentraciones empleadas fueron; 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL.

## II.XIV.III Modelos *in vivo* para toxicidad

En los últimos años, el objetivo de muchos investigadores está relacionado con el estudio de productos naturales y nuevos procedimientos de ensayo. El principal objetivo es aislar moléculas con estructuras novedosas, incluso aislar nuevos compuestos bioactivos que tengan aplicaciones potenciales o puedan servir como compuestos guías para modificaciones sintéticas (Pino Pérez and Jorge Lazo, 2010).

Un método dentro del grupo bioensayos más utilizados lo ocupa el ensayo de *Artemia spp.* Este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales analizados en larvas de *Artemia spp.* A partir de ello, se puede predecir su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos, y ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos. Además, dicho ensayo de letalidad en *Artemia salina* se basa en la posibilidad de causar muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en laboratorio a diferentes concentraciones del analito estudiado.

Este método fue propuesto por *Michael y colaboradores* y posteriormente desarrollado por *Vanhaecke* como una herramienta útil para la determinación de toxicidad (Fernández-Calienes Valdés et al., 2009). Este método en el cual se determina el valor de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de compuestos y extractos en medio salino ha sido utilizado para la detección de toxinas de hongos y cianobacterias, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados y para predecir la citotoxicidad de compuestos puros (Fernández-Calienes Valdés et al., 2009).

## II.XV. Patógenos

La resistencia bacteriana ha sido considerada un problema, ya que cada vez se hace más difícil el tratamiento de enfermedades causados por patógenos multirresistentes. De acuerdo con Vanegas, D., “Una de las principales causas de la resistencia en bacterias, es el uso indiscriminado de los antibióticos. Mismos que logran acelerar los procesos evolutivos” (2020).

Se ha demostrado que uno de los principales mecanismos que contribuye a la resistencia de bacterias de tipo Gramnegativas es el “*quorum sensing* (QS) que funciona como lenguaje de comando para coordinar el comportamiento de la población bacteriana y así permite activar la expresión de genes relacionados con los mecanismos de resistencia” (ídem). El mecanismo mencionado anteriormente es de vital importancia para adquirir resistencia ante los antimicrobianos y su producción es inducida por la molécula que lleva por nombre *N-acil Homoserina Lactona* (AHL). Con ello, se relaciona el sistema de comunicación a través de moléculas inductoras. Las cuales en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* regulan la expresión de los genes que controlan los factores de virulencia (Arévalo, 2020).

*Pseudomonas aeruginosa* está catalogada como “un bacilo Gram negativo que posee gran versatilidad metabólica. Mismo es reconocido como el principal agente nosocomial en la actualidad, es patógeno oportunista, causante del aumento de morbilidad y mortalidad de pacientes inmunosuprimidos o con enfermedades crónicas a nivel mundial” (Murthy et al., 2018). Con lo que se menciona previamente, se tomará en cuenta *pseudomonas aeruginosa* a partir de pacientes con fibrosis quística.

Al igual que ocurre en otro tipo de patógenos bacterianos, en *P. aeruginosa* la virulencia contrae distintos factores e intervienen variables que involucran tanto la misma bacteria como el hospedador.

*P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo que dispone de una gran versatilidad metabólica. Está catalogado como el agente nosocomial esencial en la actualidad. Además de ser considerado como un patógeno oportunista causante de mortalidad y morbilidad en pacientes inmunosuprimidos o con enfermedades crónicas (Vanegas, 2020).

Por otro lado, *Klebsiella pneumoniae* es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género *Klebsiella*. Está compuesto por bacterias Gramnegativas de la familia *Enterobacteriaceae* que desempeñan un papel importante en el desarrollo de enfermedades infecciosas oportunistas (Vaghasiya and Chanda, 2009). *Klebsiella pneumoniae* puede causar neumonía bacteriana, aunque suele estar implicada en infecciones hospitalarias de vías urinarias, especialmente en personas inmunodeprimidas. No obstante, *Klebsiella pneumoniae* es el segundo patógeno de vías urinarias después de *E. coli* (Vaghasiya and Chanda, 2009). Esta bacteria se ha encontrado mucho más a menudo que en el pasado. Reportes mencionan que es debido a la resistencia antibiótica que existe actualmente. Este tipo de bacteria puede desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno libre, por lo que se considera especie anaerobia facultativa. Se puede encontrar en la boca, piel y el tracto intestinal; dónde inicialmente no causa problemas infecciosos.

Al mismo tiempo, esta especie desarrolla una cápsula de polisacáridos. La cual es un factor determinante en la patogenicidad de la bacteria. La cápsula protege al microorganismo de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares; glóbulos blancos (Nair et al., 2008).

*Staphylococcus aureus* ha sido considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el ser humano y animales. Está formado por cocos Grampositivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ . Son bacterias no móviles, no esporuladas. Además, no poseen una cápsula aunque existen cepas que desarrollan una cápsula de limo y son bacterias anaerobias facultativas (J. Foster, 2002). El espectro de enfermedades es amplio y variado desde infecciones en la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. El impacto de las cepas *S. aerus* sobre la salud es la resistencia que puede presentar frente a varios antibióticos, sobre todo a la meticilina (Cervantes-García et al., 2014). No obstante, se ha reportado que el análisis molecular y genético de *S. aerus* ha revelado la

presencia de adhesinas de superficie que median la adherencia y colonización de las células blanco. Además, de la secreción de enzimas y toxinas responsables de la invasión. Así como ser la causa de enfermedades distantes del foco inicial (Bustos-Martínez et al., 2006).

Aproximadamente, 50% del genoma de esta bacteria presenta homología con *Bacillus subtilis*. Esto ha sugerido que estos dos microorganismos comparten ancestros en común.

El diagnóstico molecular es de suma importancia ya que ha incrementado la detección del agente etiológico. Esto sirve para determinar la resistencia a los antimicrobianos. Los métodos empleados están dirigidos en detectar moléculas específicas, tales como la proteína unida a la penicilina (Cervantes-García et al., 2014).

Algunas de las cepas de *S. aerus* producen una capa polisacárido extracelular denominada biofilm. Ésta es una red extracelular que ayuda a la comunidad bacteriana a adherirse a diferentes superficies (Betoni et al., 2006). Ahora bien, por otro lado, *Proteus mirabilis* es un bacilo que produce casi todas las infecciones del ser humano. Estos microorganismos forman parte de la flora fecal normal y están presentes en el suelo y agua. *P. mirabilis* a menudo es sensible a ampicilina, carbenicilina, ticarcilina, pero es resistente a tetraciclinas (Pazla et al., 2023). Esta bacteria presenta por lo general forma de bastón pero es un organismo dimórfico que posee movilidad de enjambre (Pazla et al., 2023). Además, se ha aislado de la microbiota intestinal de varios mamíferos como ganado vacuno y porcino, mascotas como perros y gatos (Rather, 2005).

Por último, *Escherichia coli* está presente como un miembro constante de la flora del tubo intestinal. Es un bacilo Gramnegativo que no forma esporas. Este tiene movimiento por medio de sus flagelos. Las bacterias Gramnegativas como *E. coli* son bacterias aerobias comensales más numerosas del intestino grueso (Parra et al., 2002). La infección más común es la infección del tracto urinario, por lo general es una infección ascendente. Además, también puede causar prostatitis y enfermedades inflamatorias pélvicas (“Infecciones por *Escherichia coli* - Enfermedades infecciosas,” n.d.). No obstante, otras cepas son capaces de causar infecciones extraintestinales, si las barreras anatómicas normales del intestino están interrumpidas. En cuyo caso, los microorganismos pueden diseminarse a estructuras adyacentes o invadir el torrente sanguíneo. También, se pueden producir infecciones hepatobiliares, peritoneales, cutáneas y pulmonares. *E. coli* puede producirse sin una puerta evidente (Kaper et al., 2004).

Siguiendo en el mismo punto, el uso de productos naturales como extractos de plantas medicinales como agentes microbianos no ha sido nuevo. Se han utilizado para controlar infecciones de bacterias patógenos a lo largo del tiempo. Sin embargo, en los últimos años, la creciente demanda de componentes bioactivos ha llevado a una respuesta social contundente para encontrar nuevos componentes o precursores que sean capaces de disminuir el uso de antibióticos y hacer frente al desarrollo de resistencias a antibióticos. Es por ello por lo que esto ha llevado a los investigadores a estudiar la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales (Santos et al., 2019).

## CAPÍTULO III



### **III.I. Hipótesis**

Los extractos; hexánico, cloroformo, acetato de etilo y metanólico y compuestos identificados en *Equisetum hyemale* tienen actividades antibacterianas y antioxidantes. La unión de extractos y compuestos aislados a nanopartículas de cobre o en liposomas mejoran su desempeño antibacteriano y antioxidante.

### **III.II. Objetivo general**

Aislar e identificar compuestos presentes de *Equisetum hyemale* y evaluar su actividad biológica; como antibacteriana y antioxidante. Además de preparar nanomateriales con extractos.

### **III.III. Objetivos específicos**

- 1) Recolectar materia vegetal y macerar parte aérea de la planta para obtener extractos de polaridad creciente (hexánico, clorofórmico, acetato de etilo, metanólico).
- 2) Realizar pruebas fitoquímicas preliminares
- 3) Analizar por técnicas espectroscópicas la composición química de los extractos obtenidos.
- 4) Sintetizar nanopartículas de cobre y liposomas para evaluar su actividad antibacteriana y antioxidante.
- 5) Realizar ensayo de toxicidad con *Artemia salina* para determinar el efecto tóxico de cada uno de los extractos.
- 6) Analizar por cromatografía en columna el extracto metanólico.

## **CAPÍTULO IV**

## **IV. Materiales**

### **IV.I. Reactivos, disolventes y equipo:**

#### **Reactivos y disolventes**

- Etanol
- Cloroformo 99.7%. Reactivo analítico
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico
- Cloruro férrico
- Reactivo de gelatina
- Ácido clorhídrico
- Viruta de magnesio amalgamado
- Hidróxido de sodio
- Polvo de zinc
- Reactivo de: Mayer, Dragendorff , Wagner y Rosenthaler
- Piridina
- Nitroprusiato de sodio
- Cloruro de antimonio
- Quercetina (Qu)
- Caldo Mueller-Hinton
- Agar Müeller-Hinton
- Fosfomicina
- Fosfolípido de diacilglicerol (POPC) 2mg/mL
- Peróxido de hidrógeno
- Sulfato de cobre

#### **Equipo utilizado y productos**

- Licuadora
- Balanza gravimétrica
- Rotavapor
- Baño de agua
- Instrumento de destilación

- Vasos de precipitado
- Pipetas graduadas
- Pipeta automática
- Placas Petri de plástico
- Autoclave
- Parrilla de agitación
- Probeta
- Mechero Bunsen
- Espátulas
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Tubos de ensaye
- Agar Müller Hinton
- Tubos Falcon™ de 50 mL
- Sonificador
- Columna
- Matraces de fondo
- Tubos Eppendorf®

#### **IV.II. Obtención e identificación de la planta**

La planta *Equisetum hyemale* fue recolectada el día 2 de abril de 2022 en Megaviveros Cabrera ubicado en Calle Manuel Gómez Morin 3101, 74360 Cabrera, Atlixco, México. Fue identificada por Dra. Amparo Bélgica Cerón Carpio y un espécimen fue depositado en el Herbario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla con número de colecta 88262.

#### **IV.III. Proceso obtención de la muestra**

Se recolectaron 930.2278 g de planta a estudiar. La planta fue secada en una campana de extracción, se extendió en papel absorbente y se dejó secar a temperatura ambiente.

#### **IV.IV. Maceración con disolventes orgánicos para la obtención de extractos**

Una muestra de 930.2278 g de material seco y molido se maceraron con 3.0 L de hexano, 3.0 L de cloroformo, 3.0 L de acetato de etilo y por último 2.0 L de metanol. El material vegetal con el disolvente se dejó reposar 3 días y la mezcla fue agitada mecánicamente. Los

disolventes se evaporaron a presión reducida hasta sequedad con un rotavapor. Los extractos fueron almacenados en frascos de vidrio para su uso posterior

#### **IV.V. Pruebas fitoquímicas preliminares**

En este apartado se describen las pruebas realizadas para la identificación de principios activos correspondientes a *Equisetum hyemale*. Cabe mencionar que se emplearon los cuatro extractos realizados.

##### **IV.V.I. Triterpenos**

Se disolvió alrededor de 0.1 mg extracto en 1 mL de cloroformo, se agregó 1 mL de anhídrido acético resbalando por las paredes del tubo y se dejó reposar en un baño de hielo. Se considera positiva la prueba en el momento en el que al añadir 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado aparece en la interfase colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul.

##### **IV.V. II. Taninos**

Se toma alrededor de 0.1 mg cada uno de los extractos para las pruebas con cloruro férrico y con reactivo de gelatina. La aparición de un precipitado denota una prueba positiva.

##### **IV.V.III. Flavonoides**

###### *a) Shinoda*

En un tubo con extracto diluido se le agregó un trocito de viruta de magnesio amalgamado. Además de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. La aparición de colores rojo profundo al magenta indican la presencia de una flavona o dihidroflavonol. Las dihidrochalconas y otros flavonoides no reaccionan.

###### *b) Pew's*

A otro tubo con extracto diluido se le agregó polvo de zinc y unas gotas de ácido clorhídrico 5 N. Sólo los dihidroflavonoides reaccionan para dar colores que van del rojo púrpura al rojo cereza. Flavonas, dihidrochalconas y otros flavonoides dan una coloración rosa o café.

###### *c) Hidróxido de sodio*

Para indicar la presencia de flavonoides, en un tubo con extracto diluido se agregaron unas gotas de hidróxido de sodio diluido. La aparición de colores como amarillo o naranja se considera positiva la prueba para dicho compuesto.

##### **IV.V. IV. Alcaloides**

Una fracción del extracto es disuelta bajo agitación en ácido clorhídrico diluido. Se filtra hasta que el filtrado se observe totalmente transparente. El filtrado se ensaya con los reactivos

para alcaloides: Mayer, Dragendorff y Wagner. Se consideran las pruebas positivas en las que se presente la formación de un precipitado.

#### **IV.V.V. Saponinas**

##### a) Con agua caliente

Se mezcla alrededor de 0.1 mg una porción del extracto con agua caliente en un tubo de ensaye y se agita de manera manual por algunos minutos. Se considera positiva la prueba en el caso de la formación de espuma estable con apariencia de panal por unos minutos.

##### b) Rosenthaler

En un tubo de ensaye, se agrega el extracto correspondiente. A cada uno de ellos se le añade una gota del reactivo de Rosenthaler y una gota de ácido sulfúrico concentrado. Las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan un color violeta.

#### **IV.V.VI. Glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas**

##### a) Legal

A una porción (alrededor de 0.1 mg) de cada uno de los extractos se le adiciona 2 o 3 gotas de piridina. Se le añade una gota de solución reciente de 5% de nitroprusiato de sodio en agua y 1 a 3 gotas de hidróxido de sodio 2N. La prueba se considera positiva cuando aparece un color rojo intenso.

##### b) Cloruro de antimonio

El cloruro de antimonio se disuelve en cloroformo y se añaden unas gotas a cada uno de los extractos. La aparición de un color violeta azulado se considera positiva.

#### **IV.VI. Preparación de medios de cultivo**

##### **IV.VI. I. Medio de cultivo Müller-Hinton**

Para preparar agar Müller-Hinton se debe de tener en cuenta que para preparar 38 g de agar se necesita 1L. Con esta referencia mencionada. Para preparar 9.5 g de agar hay que disolverlos en 250 mL de agua destilada. La mezcla se pone en agitación constante con ayuda de una parrilla con agitación. Una vez disuelto por completo, se cubre la boca del matraz con papel aluminio. El material se introduce a la autoclave y por medio de una esterilización de vapor se esterilizará los materiales; en este caso el matraz que contenga el caldo y agar Müller-Hinton.

#### **IV.VII. Preparación de placas y actividad antibacteriana**

En primer lugar, al tener el agar estéril. Se debe tener en cuenta un lugar estéril de trabajo. Se prende un mechero Fisher, y cada una de las cajas Petri se van abriendo una por una para verter aproximadamente 20 mL de agar. El matraz que contenga el agar no debe de tocar la caja Petri. Además, se debe de flamear la boca del matraz antes y después de verter agar. Una vez, que se tengan todas las cajas Petri se dejan gelificar/solidificar para proseguir con la incubación de estas a 37 °C.

En este caso se evaluaron diferentes cepas de microorganismos entre ellas; *P. aeruginosa*, *S. aerus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, y *P. mirabillis*. Cada uno de ellos fue inoculado en placa con agar Müeller-Hinton a 37°C. Después de ello, se colocaron 7 discos; 6 de ellos con 10 µL de cada una de las concentraciones de extracto y el 7° disco con 10 µL de fosfomicina como control positivo. La fosfomicina es un antibiótico utilizado para tratar infecciones en el tracto urinario. Cada una de las placas fue destinada a una bacteria y con un extracto. Los extractos evaluados para cada microorganismo fueron; hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanólico. Además, las concentraciones empleadas fueron; 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL.

#### **IV.VIII. Modelo *in vivo* para toxicidad**

Este ensayo determina el efecto letal de las sustancias analizadas en larvas de *Artemia spp.* Este ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos. En cada uno de los pocillos, se introduce 250 µL de larva de *Artemia spp.* Posteriormente, se pone el volumen correspondiente a la concentración correspondiente. Las concentraciones por utilizar son: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL. El efecto se supervisa después de 1 hora de haber puesto el tratamiento.

#### **IV.IX. Actividad antioxidante**

Los ensayos basados en la transferencia de electrones involucran una reacción óxido-reducción con el oxidante como un indicador del punto final de la misma. Entre estos ensayos, se encuentra el método DPPH. Esta molécula es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa. Dicha deslocalización intensifica el color violeta, misma que absorbe a 517 nm (Tovar del Río, 2013).

El reactivo DPPH se prepara pesando 4 mg disueltos en 100 mL de etanol. Posteriormente, este se debe de almacenar en un lugar oscuro. Asimismo, se analizaron diferentes concentraciones 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ . En cada uno de ellos, se mezcla 400  $\mu\text{L}$  de la solución de DPPH con 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones stock correspondientes al volumen calculado de cada una de las concentraciones anteriores. Cabe mencionar que el volumen de cada extracto se mezcla son 40  $\mu\text{L}$  de etanol. Se espera 30 minutos en obscuridad total. Posteriormente, se lee la absorbancia a 517 nm.

#### **IV.X. Nanopartículas de cobre**

Los extractos de plantas contienen diversos tipos de metabolitos bioactivos como flavonoides, fenoles, proteínas, terpenoides y taninos. Estos mismos actúan como agentes reductores y estabilizadores capaces de reducir las sales metálicas hasta llegar a la formación de nanopartículas (Hernández and Pérez Olguin, 2023). Las nanopartículas de cobre se pueden obtener a través de distintas técnicas como lo son; reducción química, síntesis hidrotermal, síntesis asistida por microondas, método de poliol, entre otras (Sánchez-Sanhueza et al., 2016).

Asimismo, el método que se siguió fue el siguiente, se disolvieron 0.017 g de sulfato de cobre en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, en otro vaso de precipitado se pesan 60 mg de extracto y se disuelven en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Se añaden 30 mL de la solución de cobre mencionada anteriormente. Con cuidado se agita y se calienta a 60 °C. Un cambio de color indica la formación de nanopartículas.

#### **IV.XI. Liposomas**

El método que se realizó por hidratación y sonicación. Además, de ciclos en frío. En primer lugar, la síntesis de dichos liposomas se divide en dos fases; cada una de ellas comprende un día distinto. En primer lugar, se pone 1 mL de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC), además de 1 mL del extracto a analizar en un matraz bola de 50 mL. Posteriormente, se evapora por medio de un rotavapor y se deja reposar 2 h en un desecador. Concluidas las 2 h se hidrata la muestra con la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.4 y se deja 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se deja en el refrigerador toda la noche.

Al día siguiente, al tener la muestra se pasa a un ciclo de enfriamiento por medio de 5 ciclos. El ciclo consiste en meter la solución (matraz bola) en nitrógeno líquido, baño maría a 40 °C y vortex de 10 seg. Después de ello, se sónica durante 30 min. Sin embargo, el tiempo será



dependiente del tamaño que se quiera obtener. Asimismo, se deberá de lavar una columna *flash* de sílice con 15 mL de solución amortiguadora. Verter muestra (1 mL) en la columna. Eluir muestra con 1.5 mL de solución amortiguadora, se debe de descartar las primeras 3 gotas. El resto poner el tubo Eppendorf®. Después de ello, si se tiene otra muestra. Se puede utilizar la misma columna, pero se debe de lavar otra vez con 15 mL de solución amortiguadora. No obstante, se debe de repetir el procedimiento para cada uno de los extractos.

#### **IV.XII. Caracterización de nanopartículas y liposomas**

La caracterización de las nanopartículas de cobre tanto de los liposomas fueron a partir de técnicas como FTIR, UV-Vis, DLS y SEM. En cada una de estas técnicas se tienen que tomar en cuenta las condiciones óptimas para cada una de las muestras sintetizadas.

## **CAPÍTULO V**

## V. Resultados y discusión

### V.I. Extracción

Los extractos hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanólico muestran características particulares. El primero de ellos muestra una coloración verde, de consistencia seca. Los demás son verdes oscuros, con excepción del extracto metanólico, el cual muestra una tonalidad anaranjada-amarilla con una consistencia viscosa. Las imágenes correspondientes se presentan en la Figura III.

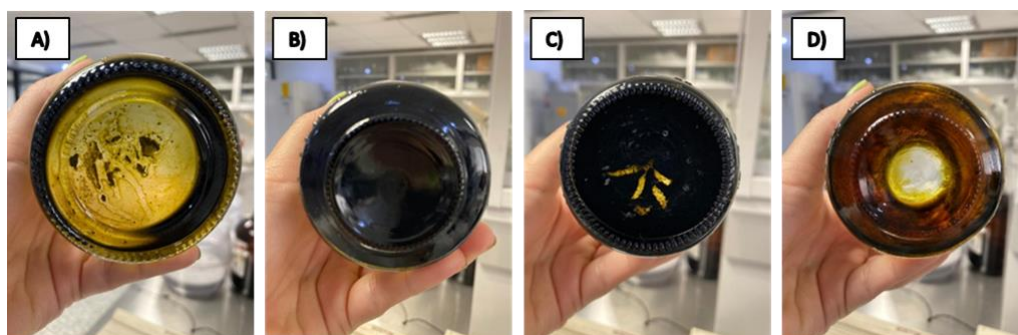


Figura III. A) Extracto hexánico, B) Extracto clorofórmico, C) Extracto acetato de etilo y D) Extracto metanólico

Tabla I. Rendimiento de extractos obtenidos de *Equisetum hyemale*

<i>Tipo de extracto</i>	<i>Peso (g)</i>
Hexano	2.8255
Cloroformo	11.5194
Acetato de etilo	3.4129
Metanol	5.6249

En la Tabla I se muestra el rendimiento de extractos obtenidos de *Equisetum hyemale*. 930.2278 gramos de parte aérea se maceraron sucesivamente con los disolventes previamente mencionados en la sección de maceración. De acuerdo con lo reportado en la Tabla I y la planta macerada se obtuvo 2.8255 g del extracto hexánico (0.30%), 11.5194 g de extracto clorofórmico (1.23%), 3.4129 g de extracto de acetato de etilo (0.366%) y 5.6249 g de extracto metanólico (0.61%).

### V.II. Pruebas fitoquímicas preliminares

De acuerdo con las pruebas fitoquímicas descritas anteriormente y los resultados reportados en la Tabla II se puede observar los resultados positivos (+) o negativos (-) a los que cada uno de los extractos estuvo expuesto.

Los metabolitos secundarios son sustancias sintetizadas por la planta que no son esenciales para su desarrollo primario. Estos compuestos las hacen competitivas en su propio entorno y ejercen una amplia gama de efectos sobre la misma planta y sobre otros seres vivos. Además, inducen fructificación y abscisión; mantienen el crecimiento perenne o señalan el comportamiento caducifolio, entre otros efectos. (Teoh, 2015).

Tabla II. Resultados de pruebas fitoquímicas preliminares para los 4 extractos (hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanólico)

Donde + es positivo y – es negativo.

<i>Prueba fitoquímica</i>	<i>Prueba</i>	<i>Extracto hexánico</i>	<i>Extracto clorofórmico</i>	<i>Extracto acetato de etilo</i>	<i>Extracto metanólico</i>
<b>Alcaloides</b>	Mayer	-	+	-	+
	Dragendorff	-	+	-	-
	Wagner	-	+	-	-
<b>Saponinas</b>	Agua caliente	-	-	+	+
	Rosenthaler	-	-	-	-
<b>Taninos</b>	Cloruro férrico	-	-	+	-
	Gelatina	-	+	-	+
<b>Flavonoides</b>	Shinoda	-	-	-	+
	Pew's	-	-	-	-
	Hidróxido de sodio	-	-	-	+
<b>Glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas</b>	Legal	-	-	-	+
	Cloruro de antimonio	+	-	-	-

	Baljet	-	-	-	+
--	--------	---	---	---	---

Los disolventes no polares como el hexano y el cloroformo se utilizan con frecuencia para extraer compuestos bioactivos como terpenoides, grasas y aceites. A consecuencia de ello, los extractos hexánico y clorofórmico dieron positivo a pruebas dónde se pueden obtener compuestos no polares. Por el contrario, se utilizan disolventes polares como el metanol para extraer compuestos altamente polares como polifenoles y flavonoides (Teoh, 2015).

### V.III. Pruebas de actividad biológica

#### V.III.I Método Kirby-Bauer o difusión en disco

En la Tabla III se puede apreciar los resultados de las pruebas antibacterianas contra 5 cepas de bacterias. Se puede observar que a las concentraciones trabajadas no se detectó actividad de ninguno de los extractos. En dicha prueba, el control positivo fue fosfomicina; este antibiótico se emplea principalmente para tratar enfermedades del tracto urinario. Con lo mencionado anteriormente, las bacterias que mostraron resistencia a la fosfomicina fueron *P. aeruginosa* y *S. aureus*. La fosfomicina es un fármaco bactericida que interrumpe la síntesis de la pared celular mediante la inhibición de fosfoenolpiruvato sintetasa y por lo tanto interfiere con la producción de peptidoglicano (“Fosfomicina - Enfermedades infecciosas,” n.d.) (Garau et al., 2001).

Como se puede ver en la Tabla III se muestran los resultados de actividad antimicrobiana de los extractos de *E. hyemale*. La fosfomicina tuvo actividad contra *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*. Mientras que para *P. aeruginosa* y *S. aureus* no tuvo halo de inhibición reportado.

Tabla III. Resultados de actividad antibacteriana de extractos de *E. hyemale*.

Donde ND significa no detectado.  $C_3 = 150 \mu\text{g/mL}$ .

Bacteria	Sensibilidad/Resistente	Control positivo	Inhibición fosfomicina (mm)
<b>Extracto hexánico</b>			
<i>E. coli</i>	ND	Fosfomicina	14
<i>P. aeruginosa</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>P. mirabilis</i>	ND	Fosfomicina	24
<i>S. aureus</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>K. pneumoniae</i>	ND	Fosfomicina	32
<b>Extracto clorofórmico</b>			
<i>E. coli</i>	ND	Fosfomicina	14
<i>P. aeruginosa</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>P. mirabilis</i>	ND	Fosfomicina	37
<i>S. aureus</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>K. pneumoniae</i>	C <sub>3</sub> = 8 mm	Fosfomicina	36
<b>Extracto acetato de etilo</b>			
<i>E. coli</i>	ND	Fosfomicina	14
<i>P. aeruginosa</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>P. mirabilis</i>	ND	Fosfomicina	27
<i>S. aureus</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>K. pneumoniae</i>	ND	Fosfomicina	31
<b>Extracto metanólico</b>			
<i>E. coli</i>	ND	Fosfomicina	14
<i>P. aeruginosa</i>	ND	Fosfomicina	0

<i>P. mirabilis</i>	ND	Fosfomicina	26
<i>S. aureus</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>K. pneumoniae</i>	ND	Fosfomicina	31

Como se puede observar en la Tabla III. Resultados de actividad antibacteriana de extractos de *E. hyemale* se puede observar que no se detectó por este método y a las concentraciones mencionadas. Sin embargo, con el extracto clorofórmico se puede observar un halo de inhibición de 8 mm con 150  $\mu\text{g/mL}$ , en comparación con el control positivo que fue de 36 mm, sin embargo, con las concentraciones posteriores no se observó ningún halo en *K. pneumoniae*.

Por otro lado, se ha reportado que las propiedades de *E. hyemale* han sido empleadas para inhibir la formación de biofilms por parte de *P. aeruginosa*. Estos resultados fueron atribuidos al contenido de compuestos fenólicos y su actividad antimicrobiana debido a los mecanismos de acción como la inhibición de proteínas y la producción de peptidoglicanos (Santos Alves et al., 2023). Sin embargo, otros reportes mencionan que los compuestos clave para la actividad antibacteriana de dicha planta son los flavonoides, ya que tienen una estructura lipofílica y debido a la presencia de grupos hidroxilo y la cadena hidrocarbonada permite la entrada de células microbianas (Zhu and Jiang, 2018).

#### **V.III.II Ensayo de toxicidad *Artemia salina***

La *Artemia salina* es un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica y de muy diversas estructuras químicas (Pino Pérez and Jorge Lazo, 2010). En este modelo y ensayo se busca determinar la toxicidad de los 4 extractos obtenidos de *E. hyemale* a distintas concentraciones o el porcentaje de mortalidad que produce una sustancia.

Para cada uno de los extractos se observó que en cada uno de los pozos de la placa de 96 pocillos no se tuvo algún efecto negativo a partir de las concentraciones de cada uno de los extractos. Las concentraciones utilizadas fueron; 50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ . En cada uno de los pocillos se depositó una cantidad de *Artemia salina* y se observó el efecto de cada concentración en esta misma.

Para cada uno de los extractos no se observó un comportamiento tóxico, ya que no hubo desechos o muerte de alguna especie.

### V.III.III Actividad antioxidante

En la Figura IV se puede observar la actividad antioxidante evaluada por el método de DPPH a distintas concentraciones de cada uno de los extractos vegetales de diferentes polaridades; hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanólico. Además, con los valores obtenidos de la actividad, se graficaron y realizó una regresión lineal para poder obtener el valor  $IC_{50}$ , este valor nos indica la eficacia de un compuesto o sustancia para inhibir la actividad en un 50% (“When Does the  $IC_{50}$  Accurately Assess the Blocking Potency of a Drug? - PMC,” n.d.). En primer lugar, con el extracto hexánico a una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  se inhibieron 1.85% de radicales libres. Por otro lado, a la misma concentración se inhibieron 1.97 %, 1.95% y 4.94% de radicales a partir de los extractos clorofórmico, acetato de etilo y metanólico, respectivamente. Por consiguiente, al tener en cuenta la actividad antioxidante de la quercetina se utilizó como control e inhibió 10.46% de radicales. La quercetina destaca por sus propiedades antioxidantes y esto permite proteger al cuerpo de los radicales libres; moléculas inestables que pueden incrementar el riesgo de contraer enfermedades y acelerar el envejecimiento (Ravichandran et al., 2014). Asimismo, se analizaron diferentes concentraciones 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ . En cada uno de ellos, se observó una inhibición mayor conforme se incrementaba la concentración y la polaridad del extracto. En dónde se tuvo una mayor actividad antioxidante fueron a concentraciones de 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, ninguno de los extractos tuvo una actividad mayor a la quercetina.

Se ha reportado la actividad antioxidante del extracto metanólico, acuoso y etanólico de *E. hyemale*. Los resultados obtenidos en dicho estudio fueron evaluados a una concentración de 300  $\mu\text{g/mL}$ . La actividad antioxidante por el método DPPH para el extracto metanólico fue de 27.36 %, del extracto acuoso fue de 35.99 % y para el extracto etanólico fue de 22.53 % de radicales (Jiang et al., 2012). Por último, se toma en cuenta los valores  $IC_{50}$  obtenidos para cada extracto. Para el extracto hexánico se obtuvo un valor de 303.54  $\mu\text{g/mL}$ , para el extracto clorofórmico un valor de 913.99  $\mu\text{g/mL}$ , un valor de  $IC_{50}$  de 1111.11  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto de acetato de etilo. Para el extracto metanólico se obtuvo un valor de  $IC_{50}$  de 176.57  $\mu\text{g/mL}$ . En comparación con la quercetina que tuvo un valor de 70.57  $\mu\text{g/mL}$ .



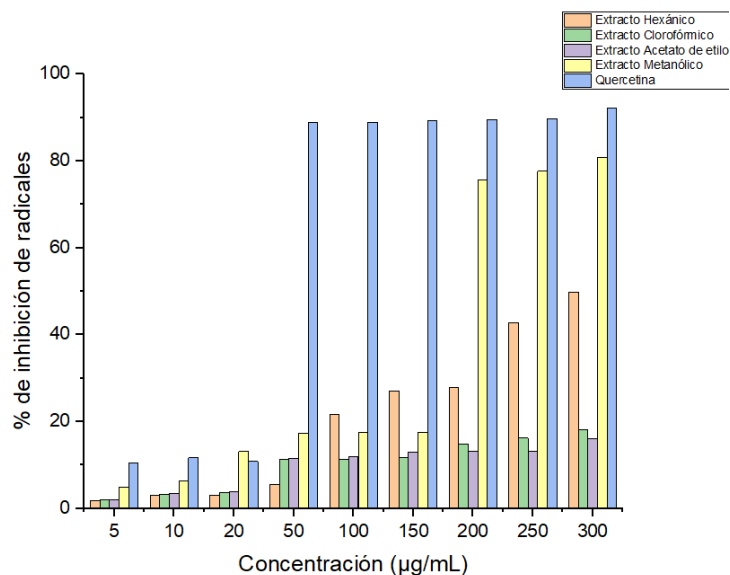


Figura IV. Actividad antioxidante DPPH extractos *E. hyemale*

### V.III.III.I Actividad antioxidante de CuNPs

En la Figura V se puede observar la actividad antioxidante evaluada por el método de DPPH a distintas concentraciones de cada uno de los extractos vegetales de diferentes polaridades; hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanólico. Sin embargo, a comparación de la Figura IV, la actividad es el extracto con la nanopartícula de cobre; el efecto que tienen ambos. Además, con los valores obtenidos de la actividad, se graficaron y realizó una regresión lineal para poder obtener el valor  $IC_{50}$ . En este caso la actividad antioxidante se evaluó desde 50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ . En primer lugar, las CuNPs y el extracto hexánico se inhibieron 49.86 %, 55.89%, 58.24%, 58.47%, 61.22% y 62.5% radicales libres a 50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Por otro lado, por parte del extracto clorofórmico y las nanopartículas de cobre se obtuvo un comportamiento similar. A 50  $\mu\text{g/mL}$  se inhibieron 41.12 % de radicales DPPH libres. Mientras que, a esa misma concentración, con el extracto de acetato de etilo y metanol la inhibición fue de 57.18% y 58.97% de radicales libres. La actividad con el extracto polar, es decir el metanólico. Sin embargo, no logra superar la actividad antioxidante de la quercetina. A una concentración de 300  $\mu\text{g/mL}$  se observa una inhibición mayor de radicales libres por parte de cada uno de los extractos y las nanopartículas. Se inhibieron 63.84% de radicales DPPH con el extracto clorofórmico, 62.12% con el extracto de acetato de etilo y 75.05% de radicales libres con el extracto metanólico.

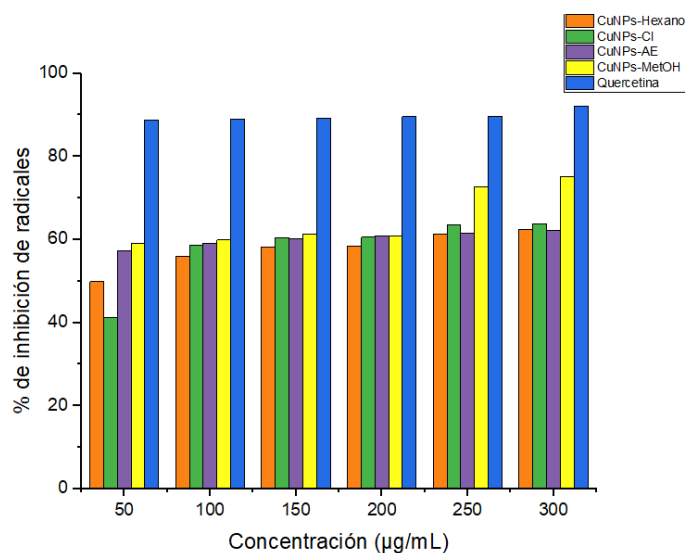


Figura V. Actividad antioxidante DPPH extractos *E. hyemale* y CuNPs.

Por último, se toma en cuenta los valores  $IC_{50}$  obtenidos para cada extracto con nanopartícula. Para el extracto hexánico con nanopartículas de cobre se obtuvo un valor de  $50.39 \mu\text{g/mL}$ , para el extracto clorofórmico con CuNPs se tiene un valor de  $65.93 \mu\text{g/mL}$ , un valor de  $IC_{50}$  de  $2.57 \mu\text{g/mL}$  para el extracto de acetato de etilo con CuNPs. Para el extracto metanólico con CuNPs se obtuvo un valor de  $IC_{50}$  de  $1.63 \mu\text{g/mL}$ .

#### V.III.IV Contenido total de flavonoides: extractos metanólico y acetato de etilo

El ensayo; contenido total de flavonoides (TFC) es un método colorimétrico ampliamente utilizado para evaluar la presencia de flavonoides en extractos de plantas. Esta técnica está basada en la capacidad del cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) para formar complejos con los grupos hidroxilo y carbonilo de diversos flavonoides (Pollio et al., 2016).

Los flavonoides constituyen una categoría de metabolitos secundarios. Cabe recalcar, que la estructura de los flavonoides está formada por dos anillos bencénicos unidos a un anillo pirano de tres carbonos. De acuerdo con el número de grupos funcionales, los flavonoides se pueden clasificar en flavonoles, flavonas e isoflavonas (Rahim et al., 2022).

Velioglu et al. (1998) reportaron que no hay correlación entre la actividad antioxidante y el contenido total de flavonoides en algunas de las especies de *Equisetum* (Velioglu et al., 1998). Sin embargo, en este método se muestra una correlación buena ( $R^2 = 0.993$ ). Este método se realizó por medio de la construcción de una curva de calibración considerando varias concentraciones de Quercetina (Qu) (100, 150, 200, 250 y  $300 \mu\text{g/mL}$ ) para estimar el

TFC del extracto metanólico y de acetato de etilo de *E. hyemale*. Para realizar el ensayo se consideró a Qu ya que es un flavonol que reacciona con  $\text{AlCl}_3$  debido a su grupo ceto en el C4 y a sus grupos hidroxilo en C3 o C4. Por lo tanto, utilizando la ecuación de regresión lineal ( $y = 0.0028x + 0.0727, R^2 = 0.993$ ). El TFC de cada uno de los extractos mencionados fueron reportados en quercetina por gramo de extracto de la planta (mg Qu/g). Se toma en cuenta la ecuación presentada, donde  $y$  representa la absorbancia de la muestra ensayo, mientras que  $x$  se valoró como la concentración de la curva de calibración. De acuerdo con los cálculos realizados el TFC del extracto metanólico es de 84.64 mg Qu/g. Mientras que en el extracto de acetato de etilo fue de 18.71 mg Qu/g. Por otro lado, se ha reportado el contenido total de flavonoides para el extracto acuoso-etanólico de *E. hyemale* por Pandey et al. (2017), este fue de 332.32 mg/g (Pandey and Khatoon, n.d.). Mientras que los resultados obtenidos para el extracto metanólico fueron 224.04 mgTAE/g, utilizando como control positivo a ácido tánico (Jiang et al., 2012).

#### **V.IV. Cromatografía en columna sílica gel**

La cromatografía en columna es una técnica que se emplea para la separación de mezclas o sustancias a escala preparativa. La columna se rellena con un adsorbente que actúa como fase estacionaria, generalmente es gel de sílice o alúmina (Senso Rodriguez, 2000). Se coloca en la parte superior la mezcla, en este caso fue el extracto metanólico de *E. hyemale*. Posteriormente, la fase móvil; cada uno de los solventes, pasan por la columna de arriba hacia abajo. En primer lugar, se eluyó con 250 mL de hexano; el paso anterior se realizó dos veces. Posteriormente, se cambió la polaridad con 9:1 (hexano: cloroformo), así consecutivamente. La polaridad de 7:3 se realizó de igual manera dos veces ya que con esta se había obtenido muestra observada en la placa de sílice. Después de ello, diez fracciones con una polaridad 6:4, diez fracciones con una polaridad 5:5. Se prosiguió con 4:6, 3:7, 2:8 y por último 1:9. Por último, se eluyó con 250 mL de cloroformo.

#### **V.V. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)**

La espectroscopía infrarroja como se mencionó anteriormente se basa en la absorción de luz infrarroja por analitos orgánicos e inorgánicos. En esta técnica, se puede observar un huella distintiva para cada uno de las moléculas (Skoog et al., 2017). En el caso de los extractos de plantas, el espectro FTIR se puede utilizar para estudiar la composición química en muestras

sólidas y líquidas. Sin embargo, aunque se puedan observar bandas características correspondientes a ciertos metabolitos no se confirman su presencia en el extracto.

La Figura VI muestra cada uno de los extractos de *Equisetum hyemale* utilizando un Cary 630 Fourier-transform infrared (FTIR) spectrometer® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). En el extracto metanólico se puede observar una banda ancha característica de O-H entre 3500 a 3200  $\text{cm}^{-1}$ , esta banda es característica de grupos hidroxilo, normalmente atribuido a compuestos fenólicos. Este hallazgo podría sugerir la presencia de compuestos reportados como quercetina, ácido cinámico, ácido clorogénico, ácido cafeico, rutina, ácido cafeoil tartárico, kaempferol o luteolina (Aguayo-Morales et al., 2023; Park and Tomohiko, 2011). También, se pueden observar bandas características a estiramientos C-O. Está documentado que la quercetina presenta una serie de bandas de 1260 a 1160  $\text{cm}^{-1}$  que está relacionada con el enlace C-O estirado del anillo de éter arílico de su estructura (Aguayo-Morales et al., 2023).

Por otro lado, otras bandas que se pueden observar en la Figura VI en los distintos extractos son bandas con intensidades menores alrededor de 2935-2910  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales representan estiramientos tipo C-H correspondientes a moléculas orgánicas típicas de la materia orgánica aérea de la planta (de Queiroz et al., 2015).

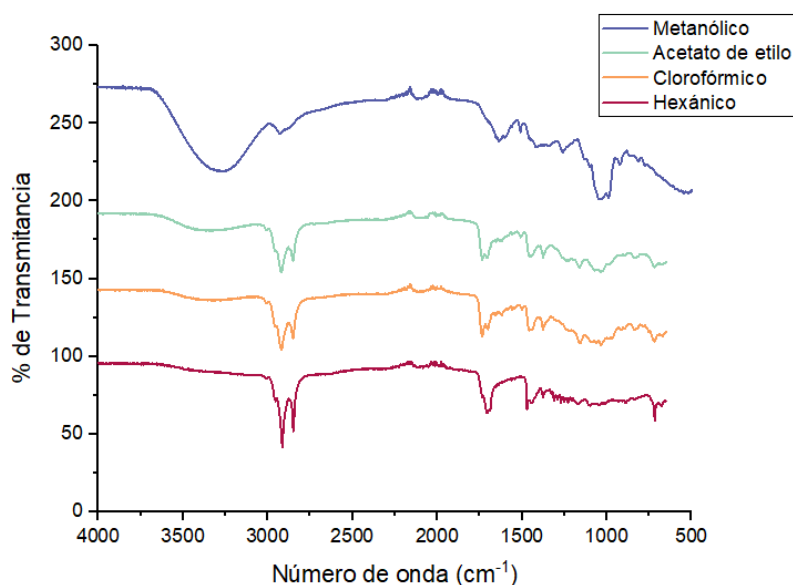


Figura VI. Análisis FTIR de *Equisetum hyemale* hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol.

Las bandas en la región entre 1600 y 1475  $\text{cm}^{-1}$  indican la presencia de enlaces C=C, abundantes en compuestos aromáticos con núcleo fenilo. En la región entre 1420  $\text{cm}^{-1}$  y 1200

$\text{cm}^{-1}$ , se encuentra la banda correspondiente a la vibración de flexión del enlace C-H de los grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ) y los ácidos carboxílicos. Además, los picos entre  $1200$  y  $1100 \text{ cm}^{-1}$  están probablemente relacionados con la presencia de grupos C-O que se atribuyen a grupos arilo de anillos aromáticos, generalmente fenilos. Sin embargo, las bandas entre  $1000$  y  $900 \text{ cm}^{-1}$  están relacionadas con las vibraciones de los enlaces C-O-C de los posibles carbohidratos que quedan en el extracto (Sureshkumar et al., 2023). Por otro lado, las bandas atribuidas a O-H entre  $3500$  a  $3200 \text{ cm}^{-1}$ , son característica a grupos hidroxilo, normalmente atribuido a compuestos fenólicos.

### V.V.I FTIR de CuNPs

En la Figura VII se muestra el espectro IR de cada una de las nanopartículas de cobre sintetizadas con cada extracto obtenido; hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanólico. Las bandas atribuidas a las nanopartículas de cobre se pueden apreciar en  $523 \text{ cm}^{-1}$  y  $1011 \text{ cm}^{-1}$  atribuidas a las distintas vibraciones entre el Cu y O. Entre  $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  indica enlace Cu-O de las nanopartículas de sulfato de cobre (Amjad et al., 2021). Los demás picos se pueden atribuir al distinto extracto utilizado.

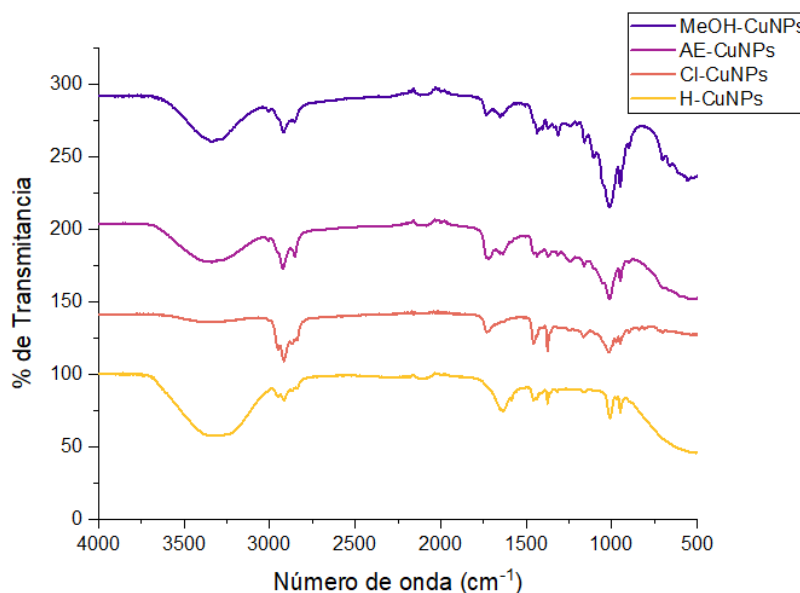


Figura VII. Análisis FTIR de CuNPs con extractos de *E. hyemale*.

### V.VI. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

RMN es una técnica que como se mencionó previamente se emplea principalmente para la elucidación de estructuras moleculares. Aunque también se puede emplear con fines cuantitativos y en estudios cinéticos y termodinámicos (Ramírez, n.d.).

Para cada uno de los extractos obtenidos de *E. hyemale* se obtuvo su espectro correspondiente. Los espectros se pueden encontrar en la parte de anexos.

Algunas de las señales que aparecen son entre 6-7 ppm, esto puede estar relacionado con desplazamiento de hidrógenos en anillos aromáticos atribuidos a flavonoides. Por otro lado, entre 0.5-2 ppm normalmente son atribuidos a hidrógenos pertenecientes a cadenas carbonadas de lípidos. En la literatura se han reportado desplazamientos atribuidos a hidrógenos metílicos entre 0.85-0.90 ppm. Entre 1.54-1.60 ppm se han observado desplazamientos por hidrógenos  $\beta$ -carboxílicos. Por otro lado, entre 2.28-2.36 ppm se ha notado desplazamientos de hidrogenos  $\alpha$ -carboxílicos (Castro et al., 1999).

## **V.VII. Dispersión dinámica de luz (DLS)**

### **V.VII. I Dispersión dinámica de luz (DLS) NPs de cobre**

Para cada uno de los extractos se sintetizaron nanopartículas de cobre. Dentro de este método de caracterización se obtuvo el tamaño y potencial Z de cada una de las nanopartículas con su respectivo extracto. El equipo empleado fue Microtrac<sup>®</sup> Nanotracs Wave II DLS (Montgomeryville, PA, USA). A continuación, se muestran los resultados para cada uno de estos. Se debe tener en cuenta que todos los datos a mencionar se obtuvieron por medio del equipo empleado para la caracterización. Como se observa en la Figura VIII, el tamaño de nanopartícula con el extracto hexánico fue de 82.5 nm, un potencial Z de 18.0 mV y una polaridad negativa. Para el extracto clorofórmico, el tamaño reportado fue de 221 nm, un potencial Z de 38.2 mV y una polaridad negativa. Con el extracto de acetato de etilo el tamaño fue de 57.2 nm, el potencial Z fue de 20.8 mV y la polaridad negativa. Por último, para el extracto metanólico el tamaño reportado fue de 48.7 nm, potencial Z de 106.2 mV y una polaridad positiva.

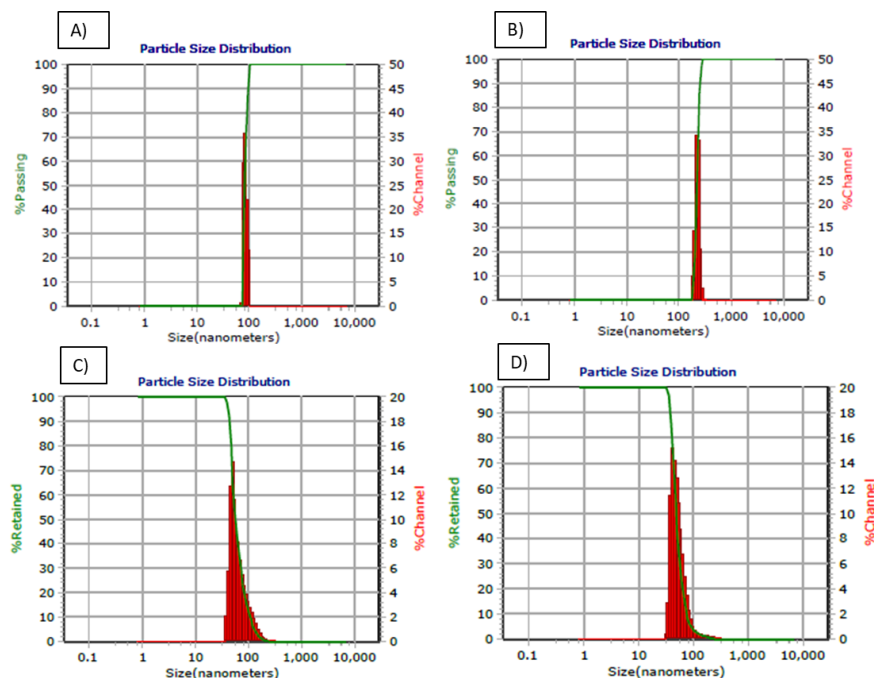


Figura VIII. Distribución de tamaño de nanopartículas de cobre con A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico, C) extracto acetato de etilo y D) extracto metanólico. Extraídas de equipo: Nanotracc Wave II

## V.VII. II Dispersión dinámica de luz (DLS) liposomas

Para cada uno de los extractos se sintetizaron liposomas de POPC a una concentración de 2mg/mL. 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) es un fosfolípido; con una cabeza polar y dos colas apolares. Dentro de este método de caracterización se obtuvo el tamaño y potencial Z de cada uno de los liposomas con su respectivo extracto. A continuación, se muestran los resultados para cada uno de estos en la Figura IX. El tamaño reportado para el liposoma con extracto hexánico fue de 60.5 nm y el potencial Z fue de 9.4 mV con polaridad negativa. Con el extracto clorofórmico, se tuvo un tamaño de 60.1 nm. Además, el valor del potencial Z fue de 0.5 mV con polaridad negativa. Para el extracto de acetato de etilo el tamaño reportado fue de 408 nm para una población del 2.4% y 82.5 nm para una población del 97.6%, con ello el potencial Z fue de 31.5 mV con polaridad negativa y para el extracto metanólico fue de 80.9 nm y su potencial Z fue de 86.9 mV con polaridad negativa

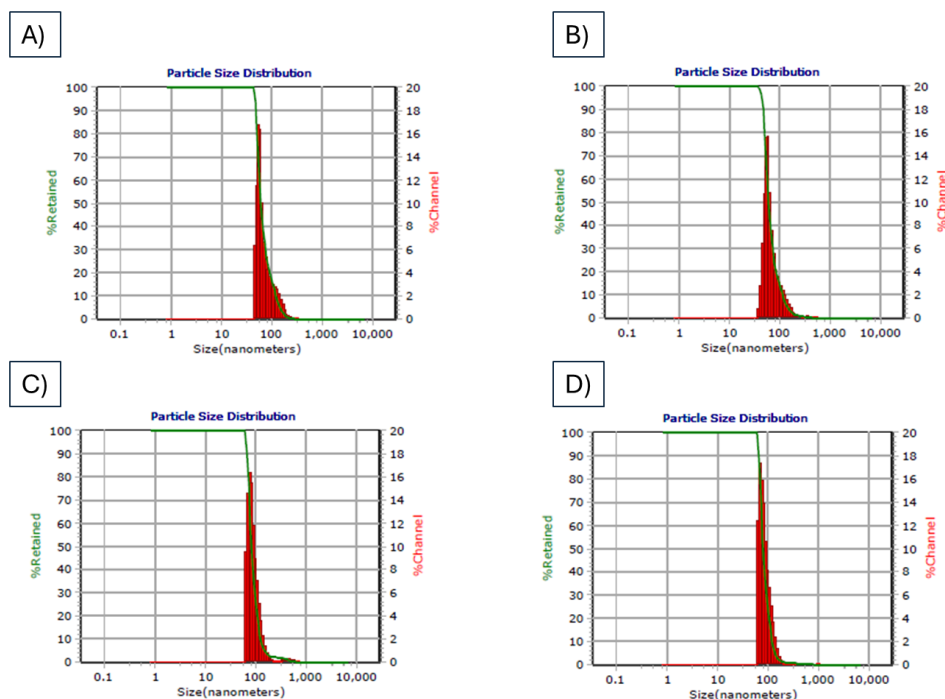


Figura IX. Distribución de tamaño de liposomas de POPC con A) extracto hexánico, B) extracto clorofórmico, C) extracto acetato de etilo y D) extracto metanólico. Extraídas de equipo: Nanotracs Wave II

Algunos estudios realizados en el Centro de Investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional (2014) mencionan que la determinación del potencial Z en liposomas es un parámetro de suma importancia ya que el valor puede indicar la relación con la estabilidad de las dispersiones coloidales. Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeñas un potencial Z alto le puede llegar a conferir estabilidad, es decir, la solución o dispersión se resistirá a la agregación (Mayoral et al., 2014).

Cuando el potencial Z es bajo, se tiene atracción entre las partículas, se supera la repulsión y se forma agregados o flóculos en lugar de dispersión. La estabilidad de los liposomas puede variar dependiendo de las condiciones a las que estén expuestos; como temperatura, tiempo de almacenamiento, síntesis, entre otros (Wang et al., 2014).

## V.VIII. Espectroscopía UV-Vis

### V.VIII. I Espectroscopía UV-Vis de Nanopartículas de cobre (CuNPs)



Se toma en cuenta la Figura X donde se observa el espectro UV-Vis de los extractos de *E. hyemale*. Se observan bandas características entre 250 a 450 nm. Se ha reportado en la literatura que algunos compuestos como ácidos fenólicos y flavonoides presentan dos bandas características en su espectro UV-Vis alrededor de 300 a 380 nm y 240 a 280 nm. Esto puede indicar la presencia de ambos compuestos en los extractos (Aguayo-Morales et al., 2023).

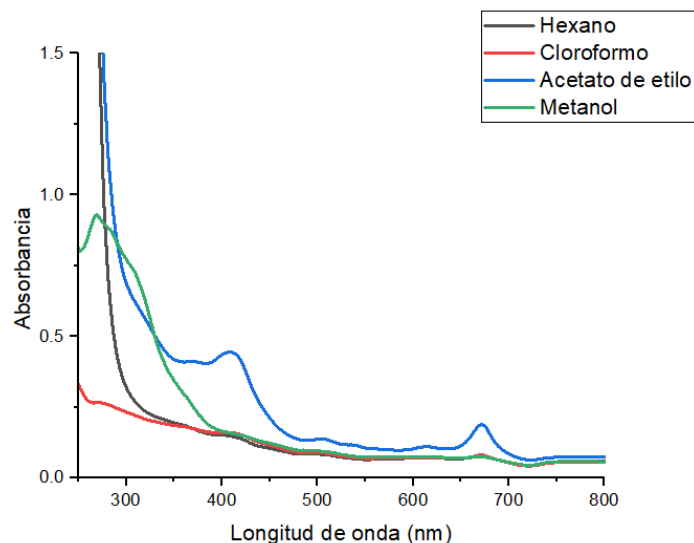


Figura X. Espectro UV-Vis extractos de *E. hyemale*.

En equipo empleado fue Cary® 60 UV-Vis espectrofotómetro (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Por otro lado, la Figura XI muestran los resultados obtenidos del espectro de cada una de las nanopartículas sintetizadas. Se puede observar que las nanopartículas de cobre con el extracto metanólico tienen una menor absorbancia a comparación con el extracto de acetato de etilo. El barrido se realizó en un rango de 400-800 nm. En cada uno de los espectros mostrados se puede notar una banda característica de nanopartículas de cobre alrededor de 679 nm.

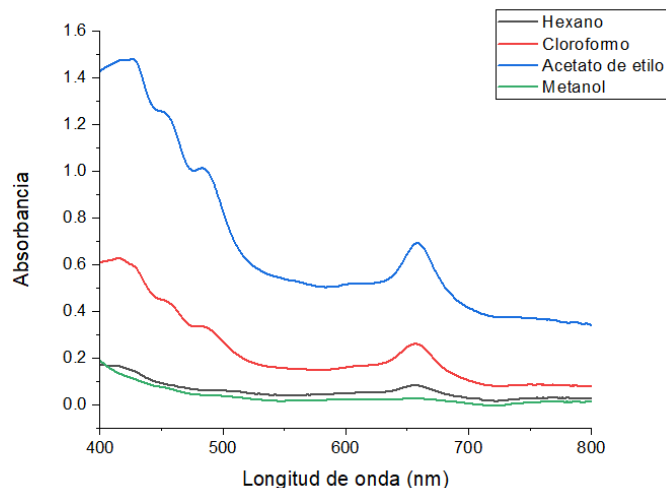


Figura XI. Espectro UV-Vis de nanopartículas de cobre con extractos de *E. hyemale*.

Se ha reportado en la literatura que la síntesis de nanopartículas de cobre a partir de sulfato de cobre tiende a un cambio de color de verde a un verde brillante o traslucido. Este cambio se puede monitorear por UV-Vis desde los 500 nm hasta 700 nm. Todo dependerá de la concentración del extracto y la técnica de síntesis empleada (Amjad et al., 2021).

#### V.VII. II Espectroscopía UV-Vis de liposomas

La Figura XI se muestran los espectros de la síntesis de liposomas con extractos de *E. hyemale*. Los liposomas sintetizados a partir de POPC y extracto hexánico, clorofórmico y acetato de etilo tiene una concentración 1:1 de cada uno de estos.

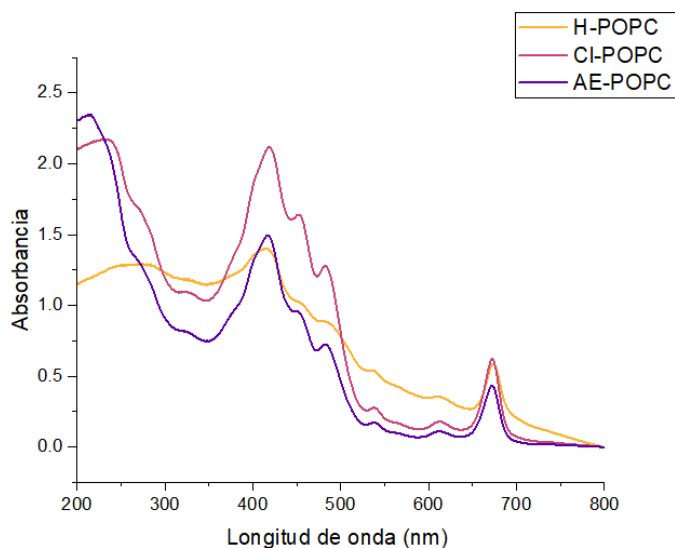


Figura XII. Espectro UV-Vis de liposomas (POPC) con extractos de *E. hyemale*.

Algunas de las bandas características de los extractos de *E. hyemale* aparecen en el espectro, dentro del rango de 300-500 nm. Por otro lado, se ha reportado que, a mayor concentración de extracto de planta, la absorbancia incrementa. A partir de ello, se puede observar el efecto que existe entre el volumen de cada liposoma con la absorbancia (Bonechi et al., 2018).

## V.IX. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

### V.IX. I. Nanopartículas de cobre (CuNPs)

Las nanopartículas de cobre (CuNPs) sintetizadas presentaron un cambio de color de un verde claro a un verde intenso brillante en algunos casos. El cambio es notorio una vez transcurrido 30 minutos después de verter la solución de cobre al extracto. Por medio de la técnica de caracterización Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) se puede observar la morfología de cada una de estas; siendo nanopartículas con extracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanólico.

Cada una de las nanopartículas de cobre que se pueden observar en la Figura XII tienden a una morfología esférica. Esta morfología se puede notar en la primera imagen denotada con la letra A; CuNPs con el extracto hexánico. Cada una de estas se observaron después de una semana de sintetizarlas.

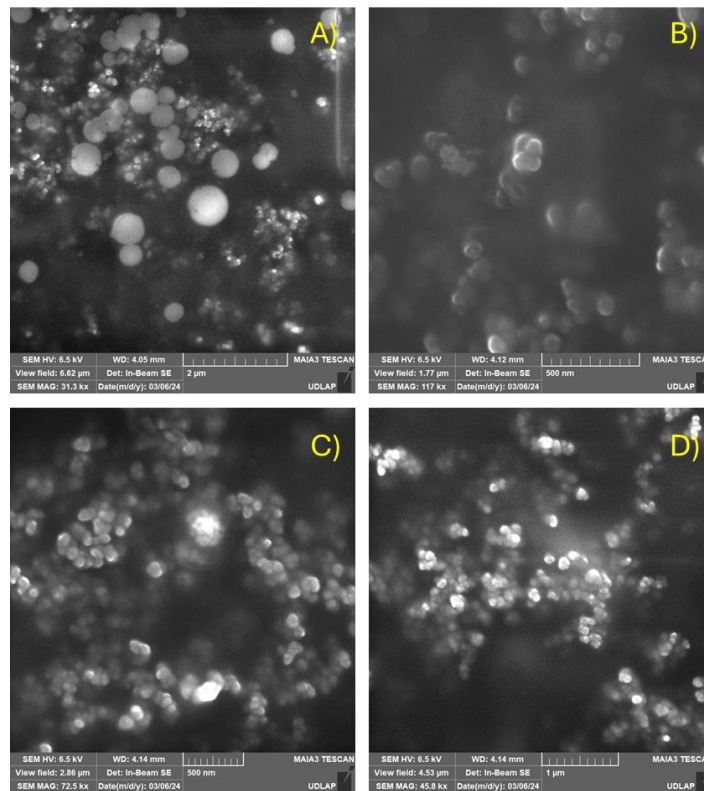


Figura XIII. Imágenes SEM de CuNPs con extractos de *E. hyemale*. A) hexano, B) cloroformo, C) acetato de etilo y D) metanol

En algunas de ellas, se observa aglomeración entre las nanopartículas, sin embargo, como se menciona anteriormente cada una de ellas conserva una morfología esférica con un tamaño distinto. Se observa que a mayor polaridad de disolvente en el extracto el tamaño de nanopartícula incrementa.

### V.IX. II. Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas cerradas que consisten en una bicapa lipídica que pueden estar compuestos por fosfolípidos sintéticos o naturales. El tamaño puede variar, esto depende del método de síntesis llevado a cabo. Sin embargo, este puede variar entre 100 nm y 2.5 micras. Con base a la laminaridad, es decir el número de capas y diámetro.

Los liposomas se clasifican en vesículas multilaminares diámetro mayor a 200 nm y vesículas grandes unilaminares con diámetro entre 100 y 400 nm. Además, con diámetros menores a 100 nm se les denomina vesículas pequeñas unilaminares (Mayoral et al., 2014).

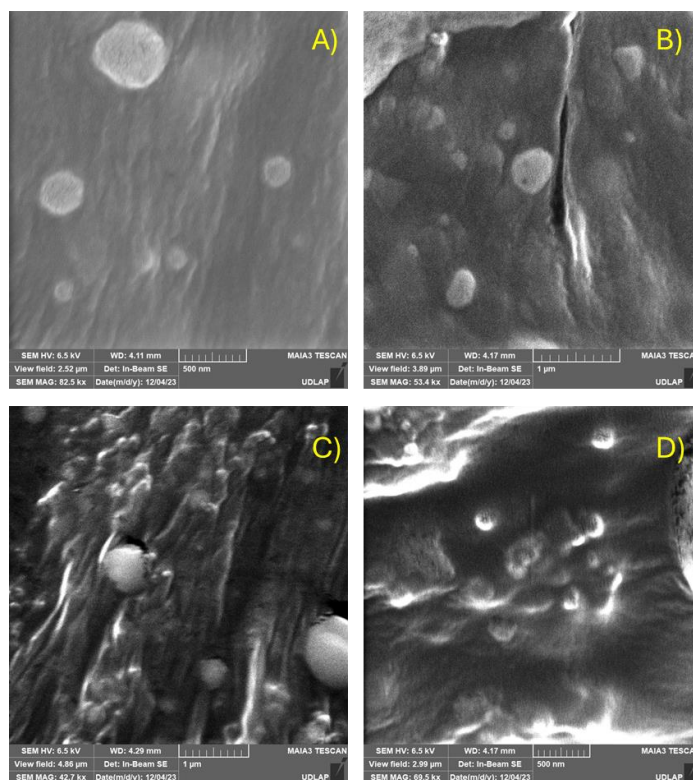


Figura XIV. Imágenes SEM de los liposomas con extractos de *E. hyemale*. A) hexano, B) cloroformo, C) acetato de etilo y D) metanol

En la Figura XIII se muestran las imágenes obtenidas a partir del SEM de liposomas con extracto hexánico de *E. hyemale*. La forma que se observa es esférica de un tamaño que varía entre 100 – 400 nm. En la imagen de la izquierda se observan liposomas de distintos tamaños, esto puede deberse a la sensibilidad de la muestra y que estos pueden estar dispersos en solución. Las imágenes se observaron una semana después de haberlos sintetizado por el método de hidratación y sonicación.

### V.X Cromatografía de gases acoplado a masas

La cromatografía de gases acoplado a masas como se mencionó anteriormente es una técnica la cual está basada en la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles. La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias analizadas entre la fase móvil y la fase estacionaria que conforman.

Extracto	Rt (min)	R Match	Match	Compuesto
Hexano	4.528	939	825	p-xileno
	6.966	877	825	Campesterol
	6.971	858	809	Ergost-5-en-o-(3beta)
	8.162	882	852	24-Metilcolesterol
	10.439	810	800	2-oleiloxi-1-etanol
	10.462	819	808	3-Icosano
	10.742	950	821	2-Hexadecen-1-ol
	10.954	946	841	2-Hexadecen-1-ol
	10.977	945	877	Fitol
	10.982	829	801	9-Eicosano
	11.257	858	827	Éster metílico del ácido araquidónico
	11.555	883	819	Ácido palmítico
	12.012	816	758	1-mono-linolenina
	12.058	822	785	Lupenona
12.276	917	898	Ácido n-hexadecanoico	
Cloroformo	6.531	911	767	Acetato de isopulegilo
	6.525	799	788	D-limoneno
	6.977	751	737	Aspidospermidin-17-ol
	7.246	781	756	5alfa-colestán-3beta-ol, 2-metileno
	7.280	754	725	Araquidonato de metilo
	7.692	886	807	p-Vinylguaiacol
	7.698	905	822	o-acetil-p-cresol
	8.230	783	762	Limonen-6-ol-pivalate
	8.304	846	737	Retinal
	8.419	831	808	5alfa-colestán-3beta-ol, 2-metileno

	9.392	788	779	1-Heptatriacontanol
	9.46	852	732	alfa-retineno
	9.512	790	750	25,26-dihidroxi-vitaminaD3
Acetato de etilo	23.554	926	919	p-Vinylguaiacol
	23.806	884	868	o-acetil-p-cresol
	24.149	841	813	4-hidroxi-2-metilacetofenona
	35.839	847	809	1-Dodecanol, 3,7,11-trimetilo
	35.930	830	828	trans-fitol
	35.953	823	817	9-Eicosano
	35.993	823	813	3-Eicosano
	36.073	830	810	Nonadecanol
	36.457	825	795	Eicosen-1-ol, cis-9
	36.880	946	851	Tetrametil-2-hexadecen-1-ol
	38.751	858	814	Ácido palmítico
	42.133	830	796	Ácido linolénico
	43.764	849	797	beta-citosterol
	47.323	910	868	n-Heptacosano
49.606	823	785	alfa-Tocoferol	

Tabla IV. Análisis GC/MS de extractos de *Equisetum hyemale*.

La Tabla IV muestra el análisis cromatográfico de gases acoplado a masas de los extractos hexánico, acetato de etilo y clorofórmico provenientes de *E. hyemale*. El equipo empleado fue Agilent Technologies 6850 Network GC System acoplado a un espectrómetro Agilent 5975C VL Mass Selective Detector (MSD). La columna utilizada fue una HP-MS (5% Phenyl Methyl Siloxane; 30.0 m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m). Cada uno de los extractos se prepararon al 1%. No obstante, se inyectaron 10 microlitros, respectivamente. Posteriormente, cada uno de los compuestos reportados fue comparado con una base de datos. Algunos compuestos identificados se han reportado en los distintos extractos, tales como éter-petróleo, etanol-agua, etanólico. hexánico, metanólico, aceite esencial de *Equisetum hyemale* y otras especies dentro de la familia de la misma planta. Por ejemplo, se identificó el ácido palmítico en el extracto hexánico y clorofórmico. Por otro lado, el mismo compuesto fue reportado en el análisis fitoquímico de *E. ramosissimum* en un porcentaje de 44.3%, 34.4% y 19.4 % en extractos metanólico, acetato de etilo y éter-petróleo, respectivamente (Sureshkumar et al., 2021). El ácido palmítico tiene un papel patológico importante en los

síndromes metabólicos, el cáncer, la inflamación, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Sureshkumar et al., 2021). En el estudio presente, se reportaron 24 compuestos en los extractos mencionados anteriormente. Sin embargo, solo 3 compuestos se reconocieron en los 3 extractos obtenidos; ácido palmítico, octacosano y hexacosano.

En *E. arvense* se ha observado diferentes compuestos como ácido oleico, ácido linoleico y trazas de alcaloides como nicotina. Sin embargo, Veit et al. (1995) aislaron 2 glucósidos del extracto metanólico. Además, se han identificado compuestos como ácido hexadecanoico, Retinol, p-Vinilguaiacol y beta-sitosterol cada uno de ellos en el extracto etanólico y etanol-agua (Boeing et al., 2021; Parrish et al., 2022).

De la misma manera, el extracto hidroalcohólico de partes aéreas de *E. hyemale* L. fue caracterizado por Queiroz et al. (2015) mediante métodos espectrofotométricos. Se detectaron e identificaron compuestos fenólicos como ácido gálico, ácido tánico, ácido clorogénico y ácido cafeico. Además, Jin et al. (2014) identificaron 9 compuestos en la fracción n-BuOH obtenida del extracto en EtOH de partes aéreas de *E. hyemale* mediante GC/MS. Los autores obtuvieron 8 compuestos conocidos, siendo los primeros en informar que el kaempferol-3-soforosido-7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y el kaempferol-7-O- $\alpha$ -L-ramnósido-4'-O- $\beta$ -D-glicopiranosido son aislado de esta planta, y un nuevo fenilglicósido, (2-(soforosil)-1-(4-hidroxifenil)etanona) (Boeing et al., 2021) (de Queiroz et al., 2015) (Jin et al., 2014).

Dentro de los compuestos identificados en la Tabla IV, algunos de ellos se han descrito en el aceite esencial obtenido de *E. hyemale*. Algunos de los compuestos que destacan son; alfa-tocoferol, fitol y ácido araquidónico (Silva et al., 2022). Cabe mencionar, que el ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-6. Este mismo regula procesos inflamatorios y de presión sanguínea (Aguayo-Morales et al., 2023).

#### **V.XI. Nanopartículas de cobre con bacterias**

El cobre presenta propiedades antimicrobianas. La síntesis o extracción de compuestos como nanopartículas con propiedades antimicrobianas es de suma importancia ya que tiene aplicaciones potencialmente prometedoras en la lucha contra el creciente número de patógenos resistentes a los antimicrobianos actualmente disponibles (Sánchez-Sanhueza et al., 2016). Estos patógenos suponen una amenaza continua para la salud humana y animal como las bacterias empleadas en este estudio.

Las nanopartículas sintetizadas fueron de cobre y se probaron frente a una serie de bacterias como: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*. El método llevado a cabo fue el mencionado anteriormente con cada uno de los extractos. El control fue fosfomicina y las concentraciones de cada una de las nanopartículas fueron 50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ . En la Tabla V se muestran los resultados frente a cada una de las bacterias seleccionadas empleando nanopartículas de cobre sintetizadas.

En la Tabla V se puede observar que los extractos hexánico, clorofórmico y acetato de etilo en nanopartículas de cobre a las concentraciones mencionadas no se presentaron actividad frente a ninguna de las bacterias. Sin embargo, con el extracto metanólico frente a *E. coli* a concentraciones de 250  $\mu\text{g/mL}$  y 300  $\mu\text{g/mL}$  presentan un halo de inhibición de 7 mm y 19 mm respectivamente. Por otro lado, el halo de inhibición por parte de la fosfomicina fue de 14 mm. Es decir, que a una concentración de 300  $\mu\text{g/mL}$  el halo es mayor con la nanopartícula.

Con *P. aeruginosa* se observó un halo de inhibición de 9 mm a una concentración de 300  $\mu\text{g/mL}$ . Se toma en cuenta que para esta bacteria Gram-negativa no tuvo halo de inhibición. A 300  $\mu\text{g/mL}$  un halo de inhibición de 12 mm se presentó frente a *S. aureus*. De igual manera, para *S. aureus* la fosfomicina no tuvo actividad frente a este patógeno. Por último, para *K. pneumoniae* se presentó un halo de inhibición en las concentraciones de 250  $\mu\text{g/mL}$  y 300  $\mu\text{g/mL}$  de 5 mm y 6 mm respectivamente. Tomando en cuenta que el halo del control positivo fue de 15 mm.



Bacteria	Sensibilidad/Resistente	Control positivo	Inhibición control positivo (mm)
<b>CuNPs Extracto hexánico</b>			
<i>E. coli</i>	ND	Fosfomicina	40
<i>P. aeruginosa</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>P. mirabilis</i>	ND	Fosfomicina	35
<i>S. aureus</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>K. pneumoniae</i>	ND	Fosfomicina	45
<b>CuNPs Extracto clorofórmico</b>			
<i>E. coli</i>	ND	Fosfomicina	37
<i>P. aeruginosa</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>P. mirabilis</i>	ND	Fosfomicina	25
<i>S. aureus</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>K. pneumoniae</i>	ND	Fosfomicina	40
<b>CuNPs Extracto acetato de etilo</b>			
<i>E. coli</i>	ND	Fosfomicina	28
<i>P. aeruginosa</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>P. mirabilis</i>	ND	Fosfomicina	35
<i>S. aureus</i>	ND	Fosfomicina	0
<i>K. pneumoniae</i>	ND	Fosfomicina	37
<b>CuNPs Extracto metanólico</b>			
<i>E. coli</i>	50 µg/mL = ND 100 µg/mL = ND 150 µg/mL = ND	Fosfomicina	14

	200 $\mu\text{g/mL}$ = ND 250 $\mu\text{g/mL}$ = 7 mm 300 $\mu\text{g/mL}$ = 19 mm		
<i>P. aeruginosa</i>	50 $\mu\text{g/mL}$ = ND 100 $\mu\text{g/mL}$ = ND 150 $\mu\text{g/mL}$ = ND 200 $\mu\text{g/mL}$ = ND 250 $\mu\text{g/mL}$ = ND 300 $\mu\text{g/mL}$ = 9 mm	Fosfomicina	0
<i>P. mirabilis</i>	ND	Fosfomicina	11
<i>S. aureus</i>	50 $\mu\text{g/mL}$ = ND 100 $\mu\text{g/mL}$ = ND 150 $\mu\text{g/mL}$ = ND 200 $\mu\text{g/mL}$ = ND 250 $\mu\text{g/mL}$ = ND 300 $\mu\text{g/mL}$ = 12 mm	Fosfomicina	0
<i>K. pneumoniae</i>	50 $\mu\text{g/mL}$ = ND 100 $\mu\text{g/mL}$ = ND 150 $\mu\text{g/mL}$ = ND 200 $\mu\text{g/mL}$ = ND 250 $\mu\text{g/mL}$ = 5 mm 300 $\mu\text{g/mL}$ = 6 mm	Fosfomicina	15

Tabla V. Resultados de actividad antibacteriana de extractos de *E. hyemale* y nanopartículas de cobre.

## **CAPÍTULO VI**

## VI. Conclusiones y recomendaciones

- Obtención de extractos de *Equisetum hyemale*

Se recolectó de manera exitosa la planta deseada. Se obtuvieron 4 extractos de polaridad distinta; hexánico, clorofórmico, metanólico y acetato de etilo con los siguientes rendimientos: 2.82, 11.51, 3.41 y 5.62% respectivamente.

- Pruebas fitoquímicas preliminares

Se demostró la presencia de metabolitos secundarios con importancia química y biológica perteneciente a *Equisetum hyemale* específicamente en el extracto metanólico, dónde se observó mayor cantidad de resultados positivos.

- Actividad antibacteriana con extractos *E. hyemale*

Se analizó la actividad antibacteriana de los extractos de *E. hyemale* contra 5 cepas; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*. Cada una de ellas fue probada contra 6 concentraciones distintas. No se detectó a dichas concentraciones actividad antibacteriana por parte de los extractos obtenidos. Sin embargo, la fosfomicina inhibe el crecimiento de *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*. Mientras que las cepas resistentes son: *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

- Actividad antibacteriana con extractos *E. hyemale* y CuNPs

Para los extractos hexánico, clorofórmico y acetato de etilo no se observa actividad antibacteriana a las concentraciones estudiadas (50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ ). Por otro lado, el extracto metanólico presentó actividad frente a *E. coli* con concentraciones de 250  $\mu\text{g/mL}$  y 300  $\mu\text{g/mL}$ . Además, se observó un halo de inhibición de 9 mm a una concentración de 300  $\mu\text{g/mL}$  frente a *P. aeruginosa*. De igual manera, A 300  $\mu\text{g/mL}$  un halo de inhibición de 12 mm se presentó frente a *S. aureus*. Por último, para *K. pneumoniae* se presentó un halo de inhibición en las concentraciones de 250  $\mu\text{g/mL}$  y 300  $\mu\text{g/mL}$  de 5 mm y 6 mm respectivamente.

- Ensayo de toxicidad de *Artemia salina*

Para cada uno de los extractos se observó que en cada uno de los pozos de la placa de 96 pocillos no se tuvo algún efecto negativo a partir de las concentraciones de cada uno de los extractos. Las concentraciones utilizadas fueron; 50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/mL}$ .

No se observó un comportamiento tóxico ya que no se observaron desechos o muertes de la especie estudiada.

- Actividad antioxidante extractos *E. hyemale*

Se evaluó la actividad antioxidante por medio del ensayo de DPPH. El extracto que tuvo mayor inhibición de radicales libres por el extracto metanólico. Además, de un valor menor de  $\text{IC}_{50}$  a comparación de los otros extractos analizados.

- Actividad antioxidante de CuNPs y extractos

De igual manera, las nanopartículas de cobre con extracto metanólico presentaron una mayor actividad antioxidante evaluado a partir del ensayo de DPPH.

- Contenido total de flavonoides: extractos metanólico y acetato de etilo

Se consideró la ecuación de la recta presentada en la sección de resultados, el contenido total de flavonoides con la metodología descrita para el extracto de acetato de etilo fue de 18.71 mg Qu/g. Por otro lado, para el extracto metanólico fue de 84.64 mg Qu/g.

- Microscopía Electrónica de Barrido de CuNPs y Liposomas

Se sintetizaron de manera adecuada nanopartículas de cobre (CuNPs) con los distintos extractos; hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y metanol. Además, con el método estudiado en la Universidad de Regina, Canadá se sintetizaron liposomas a partir de POPC. Ambos nanomateriales se caracterizaron por varias técnicas como FTIR, UV-Vis, DLS y SEM. El tamaño de cada uno de ellos varía de acuerdo con la polaridad del extracto. Sin embargo, la morfología de ambos es esférica con un poco de aglomeración en ciertas partes de la nanopartícula.

- Cromatografía de gases acoplado a masas

Se obtuvo el análisis cromatográfico de gases acoplado a masas de los extractos de *E. hyemale*. Los compuestos reportados se analizaron y compararon con una base de datos preexistente y con la literatura reportada para cada uno de estos.

- <sup>1</sup>H-RMN

Se obtuvieron los espectros <sup>1</sup>H-RMN de cada uno de los extractos reportados en este trabajo. En la discusión se reportaron algunos desplazamientos observados y comparados en la literatura. Con ello se puede elucidar los posibles compuestos que podrían estar presentes en cada uno de los extractos. Además, del análisis por espectroscopía infrarroja y cromatografía de gases acoplado a masas.

Dentro de esta investigación, quedan algunas cosas por analizar más adelante como las pruebas pendientes con los liposomas (actividad antibacteriana y antioxidante) y nanopartículas de cobre. Por otro lado, se podrían analizar otras concentraciones para poder analizar la actividad antibacteriana u otro método reportado en literatura para poder comprender las interacciones que existen entre nanopartícula-bacteria. Por otro lado, algunas perspectivas a futuro se enfocan en determinar cuestiones de acoplamiento entre el liposoma/nanopartícula y el extracto. Para poder tener un sistema de liberación posteriormente.

## **CAPÍTULO VII**

## VII. Referencias

- 2.4: Dispersión dinámica de la luz [WWW Document], 2022. . LibreTexts Español. URL [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica\\_Anal%C3%ADtica/M%C3%A9todos\\_F%C3%ADsicos\\_en\\_Qu%C3%ADmica\\_y\\_Nano\\_Ciencia\\_\(Barron\)/02%3A\\_An%C3%A1lisis\\_f%C3%ADsico\\_y\\_t%C3%A9rmico/2.04%3A\\_Dispersi%C3%B3n\\_din%C3%A1mica\\_de\\_la\\_luz](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/M%C3%A9todos_F%C3%ADsicos_en_Qu%C3%ADmica_y_Nano_Ciencia_(Barron)/02%3A_An%C3%A1lisis_f%C3%ADsico_y_t%C3%A9rmico/2.04%3A_Dispersi%C3%B3n_din%C3%A1mica_de_la_luz) (accessed 7.6.23).
- Aguayo-Morales, H., Sierra-Rivera, C.A., Claudio-Rizo, J.A., Cobos-Puc, L.E., 2023. Horsetail (*Equisetum hyemale*) Extract Accelerates Wound Healing in Diabetic Rats by Modulating IL-10 and MCP-1 Release and Collagen Synthesis. *Pharmaceuticals (Basel)* 16, 514. <https://doi.org/10.3390/ph16040514>
- Alves, C., Bonez, P., Ebling, M., Casagrande, C., Freitas, L., Dolwitsch, C., Pires, F., Sagrillo, M., de Brum, G., de Campos, M., Santos, R., Santos, R., 2019. Antimicrobial, Cyto and Genotoxic Activities of *Equisetum hyemale*. *Pharmacognosy Journal* 11, 1563–1571. <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.239>
- Amjad, R., Mubeen, B., Ali, S.S., Imam, S.S., Alshehri, S., Ghoneim, M.M., Alzarea, S.I., Rasool, R., Ullah, I., Nadeem, M.S., Kazmi, I., 2021. Green Synthesis and Characterization of Copper Nanoparticles Using *Fortunella margarita* Leaves. *Polymers (Basel)* 13, 4364. <https://doi.org/10.3390/polym13244364>
- Antonio-Pérez, A., Durán-Armenta, L.F., Pérez-Loredo, M.G., Torres-Huerta, A.L., 2023. Biosynthesis of Copper Nanoparticles with Medicinal Plants Extracts: From Extraction Methods to Applications. *Micromachines* 14, 1882. <https://doi.org/10.3390/mi14101882>
- Arévalo, D.L.V., 2020. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de plantas del género *Piper* frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Chromobacterium violaceum*.
- Barrera, E., Pardavé, M.P., Batina, N., González, I., 2000. Formation Mechanisms and Characterization of Black and White Cobalt Electrodeposition onto Stainless Steel. *J. Electrochem. Soc.* 147, 1787. <https://doi.org/10.1149/1.1393435>
- Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R.A., Gallo-Corredor, J.A., Pacheco, N.O.P., Sandoval, J.H.Á., Aristizabal, C.I.G., 2019. Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 15, 31–40. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3597>



- Betoni, J.E.C., Mantovani, R.P., Barbosa, L.N., Di Stasi, L.C., Fernandes Junior, A., 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 387–390. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000400007>
- Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Blanca Escamilla, 2023. Plantas medicinales de La Matamba y El Piñonal, municipio de Jamapa, Veracruz. URL <https://ciudadesverdes.com/download/plantas-medicinales-de-la-matamba-y-el-pinonal-municipio-de-jamapa-veracruz/> (accessed 6.9.23).
- Boeing, T., Tafarelo Moreno, K.G., Gasparotto Junior, A., Mota da Silva, L., de Souza, P., 2021. Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Equisetum* (Equisetaceae): A Narrative Review of the Species with Therapeutic Potential for Kidney Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2021, e6658434. <https://doi.org/10.1155/2021/6658434>
- Bonechi, C., Donati, A., Tamasi, G., Leone, G., Consumi, M., Rossi, C., Lamponi, S., Magnani, A., 2018. Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophys Chem* 233, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.11.003>
- Bustamante, A.E., Mercado-Longoria, R., Tijerina-Menchaca, R., Mas-Treviño, M., Torres-Rodríguez, J., n.d. Impacto de la erradicación de *Pseudomonas aeruginosa* sobre la sobrevida en pacientes con fibrosis quística del noreste de México.
- Bustos-Martínez, J.A., Hamdan-Partida, A., Gutiérrez-Cárdenas, M., 2006. *Staphylococcus aureus*: the reemergence of a pathogen in the community. *Rev Biomed* 17, 287–305.
- Čanadanović-Brunet, J.M., Četković, G.S., Djilas, S.M., Tumbas, V.T., Savatović, S.S., Mandić, A.I., Markov, S.L., Cvetković, D.D., 2009. Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology* 44, 269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01680.x>
- Carmona-Hernández, Ó., n.d. ACTIVIDAD INSECTICIDA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE NUEVE.

- Castro, O., Gutiérrez, J.M., Barrios, M., Castro, I., Romero, M., Umaña, E., 1999. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de Biología Tropical* 47, 605–616.
- Cervantes-García, E., García-González, R., Salazar-Schettino, P.M., 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Mex Patol Clin Med Lab* 61, 28–40.
- Clavijo Penagos, J.I., 2013. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos* 3, 133–146.
- Çoban, Ö., Yilmaz Usta, D., Gülbağ Pinar, S., 2023. 6 - Liposomes in photodynamic therapy, in: Kesharwani, P. (Ed.), *Nanomaterials for Photodynamic Therapy*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Woodhead Publishing, pp. 141–176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85595-2.00011-6>
- Coy Barrera, C.A., Parra, J., Cuca Suarez, L.E., 2014. Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). *Elementos* 4, 31–39.
- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC): fundamento, equipo, tipos [WWW Document], 2020. . Lifeder. URL <https://www.lifeder.com/cromatografia-liquida-alta-eficacia/> (accessed 7.6.23).
- de Queiroz, G.M., Politi, F.A.S., Rodrigues, E.R., Souza-Moreira, T.M., Moreira, R.R.D., Cardoso, C.R.P., Santos, L.C., Pietro, R.C.L.R., 2015. Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae) Extracts. *J Med Food* 18, 830–834. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0089>
- Delgado, M.D., Cerdas, J.S., 2021. Potenciales usos, desafíos y limitaciones de la determinación de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 26.
- Dos Santos, J.G., Blanco, M.M., Do Monte, F.H.M., Russi, M., Lanziotti, V., Leal, L., Cunha, G.M., 2005. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense*. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.04.017>
- Equisetum hyemale*: a new candidate for green corrosion inhibitor family, 2021. . *Int. J. Corros. Scale Inhib.* 10. <https://doi.org/10.17675/2305-6894-2021-10-1-12>

- Fernández-Calienes Valdés, A., Mendiola Martínez, J., Monzote Fidalgo, L., García Parra, M., Sario Ramos, I., Acuña Rodríguez, D., Scull Lizama, R., Gutiérrez Gaitén, Y., 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 61, 254–258.
- Ferriol Molina, M., 2019. Los equisetos. Caracteres reproductivos.
- Fosfomicina - Enfermedades infecciosas [WWW Document], n.d. . Manual MSD versión para profesionales. URL <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/fosfomicina> (accessed 2.12.24).
- Gallardo-Pérez, J.C., Esparza-Aguilar, M. de L., Gómez-Campos, A., 2006. IMPORTANCIA ETNOBOTÁNICA DE UNA PLANTA VASCULAR SIN SEMILLA EN MÉXICO: *Equisetum*.
- Garau, M., Latorre, A., Alonso-Sanz, M., 2001. Fosfomicina: un antibiótico infravalorado en infecciones urinarias por *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 19, 462–466. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(01\)72702-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(01)72702-4)
- Gautam, R., Jachak, S.M., 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews* 29, 767–820. <https://doi.org/10.1002/med.20156>
- Hernández, A., Perez Olguin, I., 2023. Nanopartículas de Cobre: Técnicas de síntesis y desarrollo de películas conductoras 11, 17–42.
- Hernández, T., García-Bores, A.M., Serrano, R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H., Peñalosa, I., Flores-Ortiz, C.M., Lira, R., Hernández, T., García-Bores, A.M., Serrano, R., Ávila, G., Dávila, P., Cervantes, H., Peñalosa, I., Flores-Ortiz, C.M., Lira, R., 2015. Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas* 18, 116–121.
- Infecciones por *Escherichia coli* - Enfermedades infecciosas [WWW Document], n.d. . Manual MSD versión para profesionales. URL <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-escherichia-coli> (accessed 10.11.23).

- J. Foster, T., 2002. 39 - *Staphylococcus aureus*, in: Sussman, M. (Ed.), *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, London, pp. 839–888. <https://doi.org/10.1016/B978-012677530-3/50258-0>
- Jiang, Y., Hu, W., Han, W., Yeo, J.-H., Wang, M.-H., 2012. Antioxidant and nitric oxide production inhibitory activities of scouring rush (*Equisetum hyemale* L.). *Food Sci Biotechnol* 21, 1037–1044. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0135-9>
- Jin, M., Zhang, C., Zheng, T., Yao, D., Shen, L., Luo, J., Jiang, Z., Ma, J., Jin, X.-J., Cui, J., Lee, J.J., Li, G., 2014. A new phenyl glycoside from the aerial parts of *Equisetum hyemale*. *Natural Product Research* 28, 1813–1818. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.947491>
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kebede, B., Shibeshi, W., 2022. In vitro antibacterial and antifungal activities of extracts and fractions of leaves of *Ricinus communis* Linn against selected pathogens. *Vet Med Sci* 8, 1802–1815. <https://doi.org/10.1002/vms3.772>
- Kvitvang, H.F.N., Andreassen, T., Adam, T., Villas-Bôas, S.G., Bruheim, P., 2011. Highly Sensitive GC/MS/MS Method for Quantitation of Amino and Nonamino Organic Acids. *Anal. Chem.* 83, 2705–2711. <https://doi.org/10.1021/ac103245b>
- Laurella, S.L., 2017. Resonancia magnética nuclear. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/62803>
- López Villarreal, S.M., Elizondo Luévano, J.H., Pérez Hernández, R.A., Sánchez García, E., Verde Star, M.J., Castro Ríos, R., Garza Tapia, M., Rodríguez Luis, O.E., Chávez Montes, A., 2022. Preliminary Study of the Antimicrobial, Anticoagulant, Antioxidant, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activity of Five Selected Plants with Therapeutic Application in Dentistry. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, 7927. <https://doi.org/10.3390/ijerph19137927>
- Martínez, G., María, E., 2012. Aplicación de la ley de Lambert-Beer en espectroscopía UV-visible.
- Mayoral, J.B., Moreno, A.C., Martín-Martínez, E.S., 2014. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas 8.

- Mimica-Dukic, N., Simin, N., Cvejic, J., Jovin, E., Orcic, D., Bozin, B., 2008. Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. *Molecules* 13, 1455–1464. <https://doi.org/10.3390/molecules13071455>
- Morán, R., Alejandro, J., 2019. Una nueva aproximación experimental en dispersión dinámica de luz.
- Moreno, J., 2001. Comparación del análisis inmunoenzimático y la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (EMIT y HPLC) para la medición de carbamacepina en muestras séricas. *Salud Mental* 24.
- Murthy, K.N.C., Monika, P., Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S., 2018. Nanoencapsulation: An Advanced Nanotechnological Approach To Enhance the Biological Efficacy of Curcumin, in: Jayaprakasha, Guddadarangavvanahally K., Patil, Bhimangouda S., Gattuso, G. (Eds.), *ACS Symposium Series*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 383–405. <https://doi.org/10.1021/bk-2018-1286.ch021>
- Nair, R., Kalariya, T., Chanda, S., 2008. Antibacterial Activity of Some Plant Extracts Used in Folk Medicine. *Journal Of Herbal Pharmacotherapy* 7, 191–201. <https://doi.org/10.1080/15228940802152836>
- Pandey, G., Khaton, S., n.d. EVALUATION OF PHYTOCHEMICAL PROFILE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EUISETUM HYEMALE L. *World Journal of Pharmaceutical Research* 6.
- Park, B.-J., Tomohiko, M., 2011. Feruloyl, caffeoyl, and flavonol glucosides from *Equisetum hyemale*. *Chem Nat Compd* 47, 363. <https://doi.org/10.1007/s10600-011-9934-0>
- Parra, M., Durango, J., Mattar, S., 2002. MICROBIOLOGÍA, PATOGÉNESIS, EPIDEMIOLOGÍA, CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR *Salmonella*. *Rev MVZ Córdoba*. <https://doi.org/10.21897/rmvz.521>
- Parrish, A.N., Lange, I., Šamec, D., Lange, B.M., 2022. Differential Accumulation of Metabolites and Transcripts Related to Flavonoid, Styrylpyrone, and Galactolipid Biosynthesis in *Equisetum* Species and Tissue Types. *Metabolites* 12, 403. <https://doi.org/10.3390/metabo12050403>
- Pazla, R., Putri, E.M., Jamarun, N., Negara, W., Khan, F.A., Zain, M., Arief, A., Yanti, G., Antonius, A., Priyatno, T.P., Surachman, M., Darmawan, I.W.A., Herdis, H.,

- Marlina, L., Asmairicen, S., Marta, Y., 2023. Pre-treatments of *Mirasolia diversifolia* using *Lactobacillus bulgaricus* at different dosages and fermentation times: Phytic acid concentration, enzyme activity, and fermentation characteristics. *South African Journal of Animal Science* 53, 429–437. <https://doi.org/10.4314/sajas.v53i3.11>
- Peng, S., Zou, L., Zhou, W., Liu, W., Liu, C., McClements, D.J., 2019. Encapsulation of Lipophilic Polyphenols into Nanoliposomes Using pH-Driven Method: Advantages and Disadvantages. *J. Agric. Food Chem.* 67, 7506–7511. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01602>
- Pino Pérez, O., Jorge Lazo, F., 2010. ENSAYO DE ARTEMIA: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUCTOS NATURALES. *Revista de Protección Vegetal* 25, 34–43.
- Pollio, A., Zarrelli, A., Romanucci, V., Di Mauro, A., Barra, F., Pinto, G., Crescenzi, E., Roscetto, E., Palumbo, G., 2016. Polyphenolic Profile and Targeted Bioactivity of Methanolic Extracts from Mediterranean Ethnomedicinal Plants on Human Cancer Cell Lines. *Molecules* 21, 395. <https://doi.org/10.3390/molecules21040395>
- Radojevic, I.D., Stankovic, M.S., Stefanovic, O.D., Topuzovic, M.D., Comic, L.R., Ostojic, A.M., n.d. Great horsetail (*Equisetum telmateia* Ehrh.): Active substances content and biological effects.
- Rahim, N.A., Roslan, M.N.F., Muhamad, M., Seenii, A., 2022. Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Content and LC–MS Profiling of Leaves Extracts of *Alstonia angustiloba*. *Separations* 9, 234. <https://doi.org/10.3390/separations9090234>
- Ramírez, A.F., n.d. Validación de un método de cuantificación por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (1HRMN). 2002.
- Rather, P.N., 2005. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environmental Microbiology* 7, 1065–1073. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00806.x>
- Ravichandran, R., Rajendran, M., Devapiriam, D., 2014. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. *Food Chemistry* 146, 472–478. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.080>
- Robatel, S., Schenk, M., 2022. Current Limitations and Novel Perspectives in Pancreatic Cancer Treatment. *Cancers* 14, 985. <https://doi.org/10.3390/cancers14040985>

- Saldías Villanueva, D.P., 2011. Evaluación de la actividad insecticida de extractos de *calceolaria talcana* y *condalia microphylla* presentes en Chile.
- Sánchez, L., 2016. Determinación de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de *Chuquiraga Jussieuif Gmel* usando la lixiviación de muestras sólidas. *Tecnología Química XXXVI*, 198–209.
- Sánchez-Sanhueza, G., Fuentes-Rodríguez, D., Bello-Toledo, H., 2016. Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals: A Systematic Review. *Int. J. Odontostomat.* 10, 547–554. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2016000300024>
- Sandhu, N.S., Kaur, S., Chopra, D., 2010. *EQUIETUM ARVENSE: PHARMACOLOGY AND PHYTOCHEMISTRY - A REVIEW.*
- Santos Alves, C.F.D., Bonez, P.C., Casagrande, C., Clerici, D.J., Verdi, C.M., Urquhart, C.G., Missel, M.V., Barin, T., Campos, E.M.M.A.D., Santos, R.C.V., 2023. Antibiofilm activity of *Equisetum hyemale*: interference with quorum sensing. *Journal of Herbal Medicine* 42, 100688. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100688>
- Santos, S.A.O., Martins, C., Pereira, C., Silvestre, A.J.D., Rocha, S.M., 2019. Current Challenges and Perspectives for the Use of Aqueous Plant Extracts in the Management of Bacterial Infections: The Case-Study of *Salmonella enterica* Serovars. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 940. <https://doi.org/10.3390/ijms20040940>
- Senso Rodriguez, A., 2000. Derivados de polisacáridos fijados sobre el gel de sílice como fases estacionarias quirales para cromatografía líquida (<http://purl.org/dc/dc/mitype/Text>). Universitat de Barcelona.
- Silva, R.M.G. da, Marques de Oliveira Moraes, V., Marinho Dos Santos, V.H., Oliveira Granero, F., Malaguti Figueiredo, C.C., Pereira Silva, L., 2022. Heavy metal accumulation efficiency and subsequent of cytogenotoxicity evaluation in the medicinal plant *Equisetum hyemale*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 85, 989–1001. <https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2139313>
- Silva, G., Pizarro, D., Casals, P., Berti, M., 2003. EVALUACION DE PLANTAS MEDICINALES EN POLVO PARA EL CONTROL DE *Sitophilus zeamais*

- MOTSCHULSKY EN MAIZ ALMACENADO. *Current Agricultural Science and Technology* 9.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2017. *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning.
- Soria, N., 2018. Medicinal Plants and their application in Public Health. *Rev. salud publica Parag.* 8, 7–8. <https://doi.org/10.18004/rspp.2018.junio.7-8>
- Sosa Parra, J.E., 2018. Estudio del equilibrio líquido-líquido de los líquidos iónicos de alquilamonio en la separación de las mezclas azeotrópica etanol e hidrocarburo alifáticos lineales a 298.15 K.
- Sureshkumar, J., Amalraj, S., Murugan, R., Tamilselvan, A., Krupa, J., Sriramavaratharajan, V., Gurav, S.S., Ayyanar, M., 2021. Chemical profiling and antioxidant activity of *Equisetum ramosissimum* Desf. stem extract, a potential traditional medicinal plant for urinary tract infections. *Futur J Pharm Sci* 7, 192. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00339-8>
- Sureshkumar, J., Jenipher, C., Sriramavaratharajan, V., Gurav, S.S., Gandhi, G.R., Ravichandran, K., Ayyanar, M., 2023. Genus *Equisetum* L: Taxonomy, toxicology, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 314, 116630. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116630>
- Teoh, E.S., 2015. Secondary Metabolites of Plants. *Medicinal Orchids of Asia* 59–73. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5)
- Tipke, I., Bückner, L., Middelstaedt, J., Winterhalter, P., Lubienski, M., Beuerle, T., 2019. HILIC HPLC-ESI-MS/MS identification and quantification of the alkaloids from the genus *Equisetum*. *Phytochemical Analysis* 30, 669–678. <https://doi.org/10.1002/pca.2840>
- Torelló, M., Viscasillas, A., del Pozo, A., 2002. Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. *Offarm* 21, 188–190.
- Tovar del Río, J., 2013. determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion Cafétera.
- Vaghasiya, Y., Chanda, S., 2009. Screening of some traditionally used Indian plants for antibacterial activity against *Klebsiella pneumonia*. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 3, 161–164.



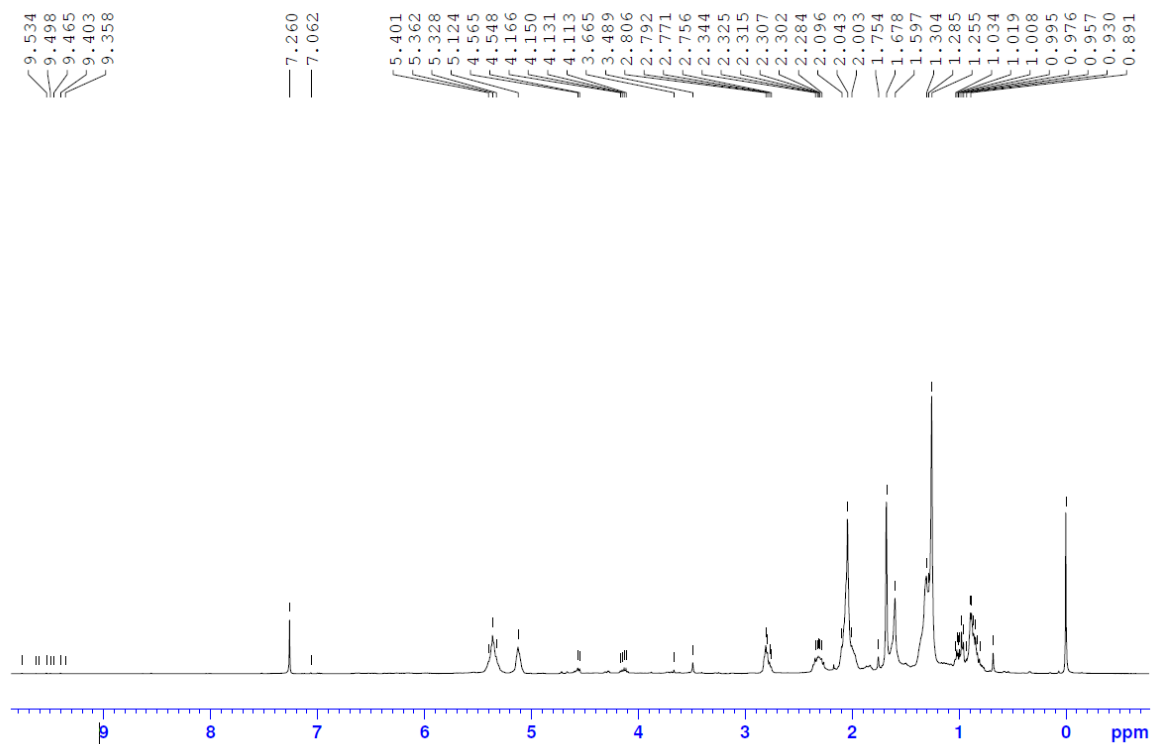
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4113–4117. <https://doi.org/10.1021/jf9801973>
- Villamizar-Véliz, M., Aular, Y., 2022. Métodos de extracción del aceite esencial de lippia alba. *Revista Ingeniería UC* 29, 3–14. <https://doi.org/10.54139/revinguc.v29i1.90>
- Villar Del Fresno, Á.M., Peinado, I.I., 2006. Equiseto. *Farmacia Profesional* 20, 74–77.
- Wang, H., Liu, M., Du, S., 2014. Optimization of madecassoside liposomes using response surface methodology and evaluation of its stability. *International Journal of Pharmaceutics* 473, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.010>
- When Does the IC50 Accurately Assess the Blocking Potency of a Drug? - PMC [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7357848/> (accessed 4.3.24).
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., Ye, W.-C., 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine* 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhu, J.-J., Jiang, J.-G., 2018. Pharmacological and Nutritional Effects of Natural Coumarins and Their Structure–Activity Relationships. *Molecular Nutrition & Food Research* 62, 1701073. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201701073>

## **CAPÍTULO VIII**

## VIII. Anexos

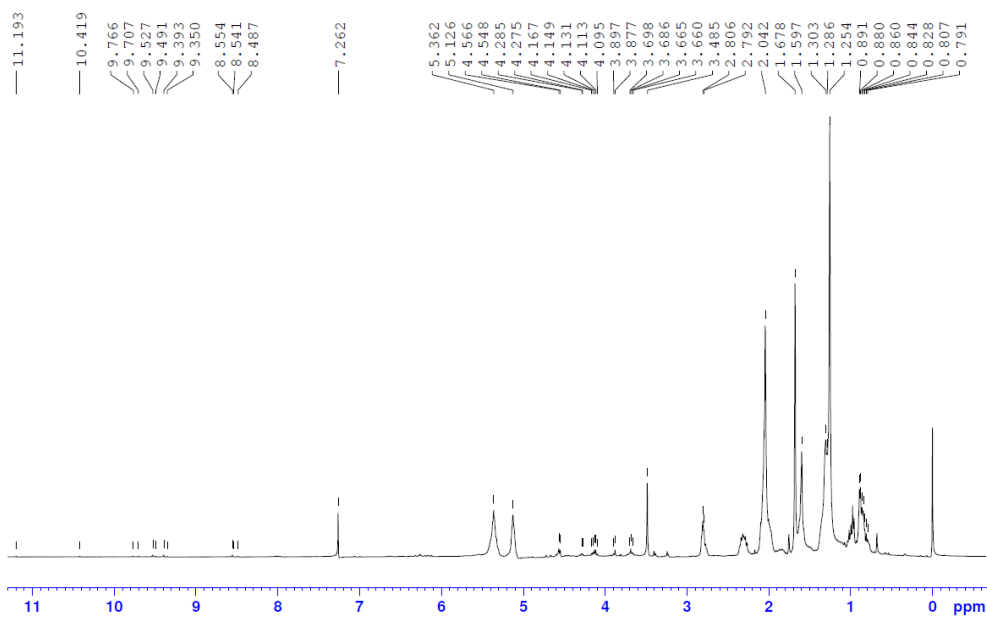
### Anexo I. Extracto hexánico analizado por Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$

Extracto hexanico

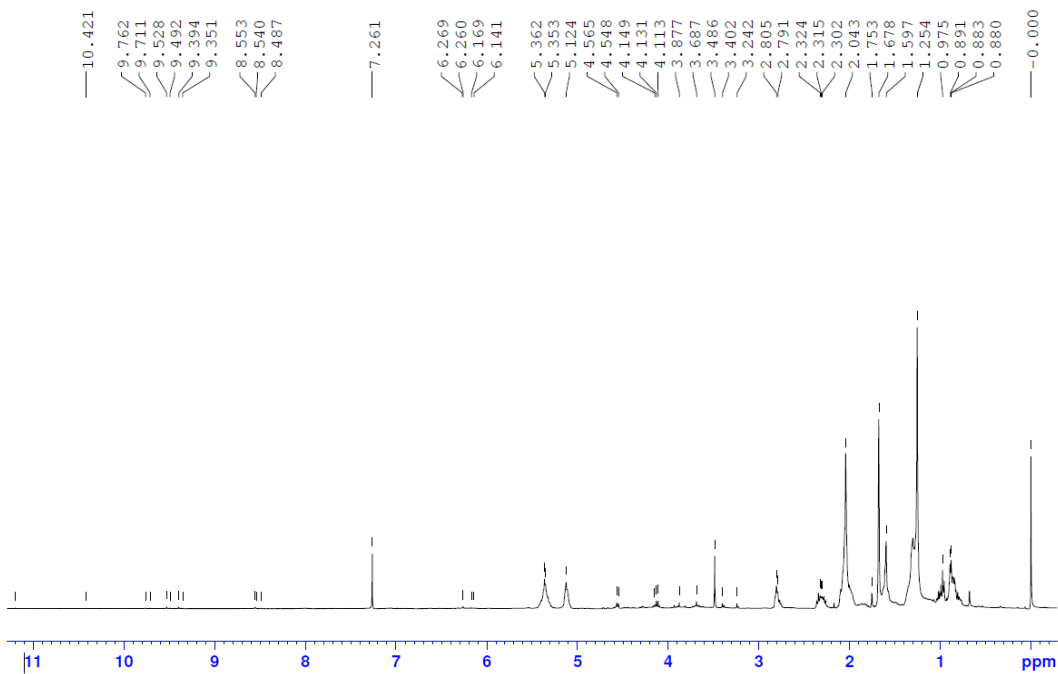


### Anexo II. Extracto clorofórmico analizado por Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$

Extracto cloroformico

Anexo III. Extracto acetato de etilo analizado por Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ 

Extracto AcOEt

Anexo IV. Extracto metanólico analizado por Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$

Extracto metanolico

